

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**KLINIKAI LABORATÓRIUMI GENETIKAI ÉS MOLEKULÁRIS
BIOLÓGIAI VIZSGÁLATOK SÚLYOS MONOGÉNES BETEGSÉGEKBEN
ÉS MULTIFAKTORIÁLIS KÓRKÉPEKBEN**



DR. BALOGH ISTVÁN

**DEBRECENI EGYETEM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
LABORATÓRIUMI MEDICINA INTÉZET
KLINIKAI GENETIKAI TANSZÉK**

Debrecen, 2020

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK	4
BEVEZETÉS	6
Egyedi monogénes betegségek vizsgálata	7
A véralvadás V-ös faktorának öröklött hiánya	7
A C típusú Niemann-Pick betegség	7
A Duchenne/Becker izomsorvadás	8
Neonatális diabetes mellitus	9
Fiatal felnőttkori diabetes (maturity-onset diabetes of the young, MODY)	9
A hypoglycaemiás hyperinsulinismus	9
Genetikai diagnosztikai módszertani fejlesztések	10
Az anyai sejt kontamináció hatása a molekuláris genetikai diagnosztikai tesztekre invazív mintavételt követő prenatális diagnosztika során	10
Piroszekvenálási alapú új generációs DNS szekvenálási rendszer analitikai paramétereinek vizsgálata	11
Monogénes kohorszok vizsgálata	12
A cystás fibrosis (CF)	12
A Smith-Lemli-Opitz szindróma	13
Az autoszomális recesszív policisztás vesebetegség	15
A Marfan szindróma	17
Multifaktoriális betegségek vizsgálata	18
A Gas6 és receptorai	19
Időskori macula degeneráció (age-related macular degeneration, AMD)	20
Az infertilitás, mint multifaktoriális kórkép genetikai meghatározottsága	21
CÉLKITŰZÉSEK	22
BETEGEK, ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	23
Monogénes egyedi esetek vizsgálata	23
Monogénes kohorszok vizsgálata	24
Populációs szintű vizsgálatok	25
DNS szintű módszerek	26
Célzott mutáció analízis	26
Sanger DNS szekvenálás	26
CNV vizsgálatok	26
Új generációs DNS szekvenálás vizsgálatok	26
Anyai sejt kontamináció szimulációs kísérletek	26
Piroszekvenálás analitikai teljesítőképességének vizsgálata	27
Vizsgálatok RNS szinten	28
mRNS vizsgálatok	28
miRNS vizsgálatok infertilitásban	28
Vizsgálatok fehérjeszinten	28
FV aktivitás és antigén tesztek, FV immunprecipitáció,	
SDS-poliakrilamid (SDS-PAGE) gél elektroforézis és immunblotting	28
Izom hisztológia, dystrophin immunhisztokémia	29
Gas6 analitikai módszerek	29
Egyéb biomarkerek vizsgálata	30
Statisztikai analízisek	31

<i>In silico</i> analízisek	32
EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS	32
FV deficiencia	32
<i>HNF4A</i> -MODY első hazai esete	33
<i>De novo</i> <i>ABCC8</i> mutáció kimutatása hypoglycaemias hyperinsulinismusban	33
Terhesség alatti mutáció-specifikus kezelés <i>KCNJ11</i> mutáció által okozott diabetesben	34
Új misszensz mutáció detektálása dystrophinopathiában	34
Kezelést megalapozó genetikai tesztelés - Niemann-Pick C	35
Az anyai sejt kontamináció hatása a molekuláris genetikai diagnosztikai tesztekre invazív mintavételt követő prenatális diagnosztika során	36
Piroszekvenáláson alapuló új generációs DNS szekvenálás analitikai paramétereinek vizsgálata	37
<i>CFTR</i> mutációk magyarországi CF betegekben	38
SLO kutatómunka	39
Monogén kohorsz vizsgálatok: Fenokópiák ARPKD-ben	42
Monogén kohorsz vizsgálatok: Marfan szindróma	44
Gas6 vizsgálatok	47
<i>CFH</i> Y402H, <i>LOC387715</i> , <i>HTRA1</i> és <i>ApoE</i> vizsgálata időskori macula degenerációban	51
A Gas6 c.834+7G>A és más jelölt gén polimorfizmusok szerepe az AMD kialakulásában	52
mikroRNS vizsgálatok férfi infertilitásban	54
Y kromoszóma mikrodeléciók Kelet-magyarországi infertilis férfiakban	55
ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK	57
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	60
AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK	61
AZ ÉRTEKEZÉSBEN NEM TÁRGYALT	
NEMZETKÖZI ÉS HAZAI KÖZLEMÉNYEK	63
FELSŐOKTATÁSI TANKÖNYV RÉSZEK	68
KÖNYVFEJEZET, SZAKTANULMÁNY	69
TUDOMÁNYMETRIAI ADATOK	70

RÖVIDÍTÉSEK

7-DHC	-	7-dehidro koleszterin
ABC	-	avidin biotin complex
ABCC8	-	ATP binding cassette subfamily c member 8 gén
ABD	-	actin binding domain
ACD	-	acid citrate dextrose
ADPKD	-	autoszomális domináns policisztás vese betegség
AMD	-	age-related macular degeneration
<i>ApoE</i>	-	apolipoprotein E gén
ARPKD	-	autoszomális recesszív policisztás vese betegség
ATP	-	adenozin trifoszfát
AZF	-	azoospermic factor
CE-IVD	-	Conformité Européenne - in vitro diagnostics
cDNS	-	komplementer DNS
<i>CDY1, 2</i>	-	chromodomain Y-linked 1, 2 gének
CF	-	cystás fibrosis
<i>CFH</i>	-	complement factor H gén
CFTR, <i>CFTR</i>	-	cystic fibrosis transmembrane regulator protein, gén
CK	-	kreatin kináz
CNV	-	copy number variation
CVS	-	chorionic villus sampling, chorion biopszia
<i>DAZ, DAZL</i>	-	deleted in azoospermia, deleted in azoospermia-like gének
<i>Dhcr7</i>	-	egér DHCR7 gén
<i>DHCR7, DHCR7</i>	-	7-dehydrocholesterol reductase protein, gén
<i>DMD</i>	-	Duchenne muscular dystrophy gén
DNS	-	dezoxiribonukleinsav
dNTP	-	dezoxinukleotid trifoszfát
<i>DZIP1L</i>	-	DAZ interacting protein 1-like gén
EDTA	-	etilén-diamin-tetraecetsav
EH	-	esélyhányados
ELISA	-	enzyme linked immunosorbent assay
<i>FBN1</i>	-	fibrillin 1 gén
<i>F13A</i>	-	véralvadási XIII-as faktor génje
FV, <i>F5</i>	-	véralvadási V-ös faktor protein, gén
<i>Gas6, Gas6</i>	-	growth arrest specific 6 fehérje, gén
<i>GCK</i>	-	glükokináz gén
gnomAD	-	genome aggregation database
HEK293	-	human embryonic kidney 293
hg19 NCBI37	-	hg19-es referencia genom
HGMD	-	human gene mutation database
HH	-	hypoglycaemiás hyperinsulinismus
<i>HNF1A</i>	-	hepatocyte nuclear factor 1 A gén
<i>HNF1B</i>	-	hepatocyte nuclear factor 1 B gén
<i>HNF4A</i>	-	hepatocyte nuclear factor 4 A gén
HMG-CoA	-	hidroxi-metilglutaril koenzim A
HP	-	homopolimer
<i>HTRA1</i>	-	high temperature requirement serine protease gén
<i>INS</i>	-	inzulin gén
INR	-	international normalized ratio
IRT	-	immunreaktív tripszinogén
K_{ATP}	-	ATP függő kálium csatorna
<i>KCNJ11</i>	-	potassium inwardly rectifying channel subfamily J member 11

K _{ir} 6.2	-	potassium inwardly rectifier
KO	-	knock out
MCC	-	maternal cell contamination
MLPA	-	multiplex ligation-dependent probe amplification
MODY	-	maturity onset diabetes of the young
mRNS	-	messenger RNS
miRNS	-	mikro RNS
MS	-	mass spectrometer
N-ABD	-	N-terminal actin binding domain
NDM	-	neonatalis diabetes mellitus
NMD	-	nonsense-mediated mRNA decay
NPC	-	Niemann Pick Type C disease
<i>NPC1</i>	-	Niemann Pick Type C1 gén
<i>NPC2</i>	-	Niemann Pick Type C2 gén
OPD	-	o-phenylenediamine dihydrochloride
PAGE	-	polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	-	polymerase chain reaction
<i>PKD1</i>	-	polycystic kidney disease 1 gén
<i>PKD2</i>	-	polycystic kidney disease 2 gén
<i>PKHD1</i>	-	polycystic kidney and hepatic disease 1 gén
PNDM	-	permanens neonatális diabetes mellitus
PS	-	foszfatidilszerin
PTAD	-	4-phenyl-1,2,4-triazoline-3,5-dione
RFLP	-	restriction fragment length polymorphism
rhGas6	-	rekombináns humán Gas6
RNS	-	ribonukleinsav
SCOS	-	Sertoli cell only syndrome
SDS	-	sodium dodecyl sulphate
SHBG	-	sex hormone binding globulin
SIFT	-	sorting intolerant from tolerant
SLE	-	systemic lupus erythematosus
SLO	-	Smith-Lemli-Opitz
SnoRNA 202	-	small nucleolar RNA 202
SNP	-	single nucleotide polymorphism
<i>SRY</i>	-	sex-determining region gén
SU	-	sulfonylurea
SUR1	-	sulfonylurea receptor 1
TAM	-	Tyro3, Axl, Mer receptorok
TBS	-	tris buffered saline
TGF- β	-	transforming growth factor beta
TNDM	-	transiens neonatális diabetes mellitus
VEGF	-	vascular endothelial growth factor
WHO	-	World Health Organization

BEVEZETÉS

A klinikai laboratóriumi genetika területébe tartozik a klinikai, klinikai genetikai ellátást végző specialisták által betegek (családok) részére nyújtott orvosi genetikai szolgáltatásokhoz kapcsolódó genetikai laboratóriumi szolgáltatások minden eleme. A klinikai laboratóriumi genetika egy olyan komplex laboratóriumi szakirány, ami széles - gyakran saját fejlesztésű - metodológiai repertoárral vizsgálja az öröklött monogénes betegségeket valamint a multifaktoriális kórképek genetikai meghatározottságát. A szakma feladata minden esetben a klinikailag releváns ismeret megszerzése és annak megfelelő interpretációja a klinikum irányába. A tesztelésnek számos következménye lehet a gyakori és ritka öröklött/genetikai betegségekkel rendelkező egyének, családok vagy populációk esetében: a klinikai laboratóriumi genetikai információ érinthet prognózist, diagnózist, differenciál-diagnózist, új vagy ismert genotípus-fenotípus összefüggéseket állít fel és eredménye alapja lehet genotípus alapú kezelésnek és prenatális diagnosztikának is.

A klinikai laboratóriumi genetika folyamatosan változó tesztrendszereket használ, a genetikai metodológia fejlődése nagyon gyorsan bevonul a diagnosztika területére. A DNS alapú tesztrendszerek, melyek a humán genom különböző felbontásban való jellemzésére szolgálnak, kiegészülnek RNS, sőt metabolit illetve fehérje alapú tesztrendszerekkel - mindig a tudományos/klinikai problémának megfelelően. Az új tesztrendszerek klinikai diagnosztikában történő optimalizálása, validálása és alkalmazása a szakma feladata, beleértve a reprodukciós döntéshozatallal és családvizsgálatokkal kapcsolatos kérdéseket, különös tekintettel az ilyenkor alkalmazandó tesztek megfelelő módszertanát és azok korlátait.

A disszertációban ismertetett tudományos munkámban vizsgálok monogénes betegségeket, azok egyedi eseteit és kohorszokat is. Kutatócsoportommal munkánk során a diagnosztikai analízishez szükséges genetikai módszertani fejlesztéseket is végeztünk és vizsgáltunk multifaktoriális kórképeket, minden esetben szem előtt tartva azt, hogy a tevékenységünk alapvetően a betegellátást, a betegségek okainak jobb megértését és magas színvonalú diagnosztikai eszköztár kialakítását szolgálja. A disszertációban vizsgált egyedi monogénes betegségek érintik a glükóz metabolizmust (neonatális diabetes mellitus, fiatal felnőttkori diabetes, hyperinsulinismus), a koleszterin metabolizmust (C- típusú Niemann Pick betegség), a véralkoholmetabolizmust (faktor V

hiány) és a vázizomrendszert (Duchenne/Becker muscularis dystrophia). Négy súlyos monogénes betegség esetén (cystás fibrosis, Marfan kór, autoszómális recesszív policisztás vese betegség és Smith-Lemli-Opitz szindróma) magyar betegcsoportokban vizsgáltuk meg az adott betegség genetikai hátterét, mely több esetben új kutatási utak indításának lehetőségét teremtette meg, akár a mutáció-specifikus kezelés megalapozását, akár a pathomechanizmus jobb megértését illetően. A multifaktoriális kórképek vizsgálata során az artériás és vénás thrombosis kialakulásában szerepet játszó Gas6 esetében először igazoltuk, hogy a fehérje a plazmában - ellentétben a thrombocyttal - jelen van és kimutattuk kapcsolatát időskori macula degenerációval, végül vizsgáltuk a férfi infertilitás genetikai hátterét.

Egyedi monogénes betegségek vizsgálata

A klinikai laboratóriumi genetika egyik legfontosabb feladata a monogénes betegségek diagnosztikája. Ehhez széles módszertani repertoárt vonultat fel és számos olyan helyzet adódik, ahol a módszertan által nyújtott lehetőségek vagy éppen azok limitációi vagy a betegség sajátosságainak felismerése önmagában tudományos értékkel bír. A disszertációban hat olyan esetet mutatok be, melyek a direkt diagnosztikán túli tanulságokkal szolgálnak.

A véralvadás V-ös faktorának öröklött hiánya

Az V-ös véralvadási faktor (FV) egy olyan nélkülözhetetlen véralvadási faktor, amelynek aktív formája a protrombin-trombin átalakulásban vesz részt. A veleszületett FV hiány a homozigóta vagy összetett heterozigóta *F5* génmutációk miatt alakul ki, előfordulása 1:10⁶. A klinikai kép a FV hiányban az enyhe tünetektől egészen az életveszélyes vérzésekig terjedhet. A *F5* gén az egyes kromoszóma hosszú karján foglal helyet 80 kb hosszúságú és 25 exont tartalmaz. Jelenleg 149 patogén FV hiányt okozó mutáció ismert. A prenatális diagnosztika minden esetben felajánlásra kerül akár amniocentézis akár chorion biopszia mintavételt követően és ebben az esetben kritikus a családi mutáció ismerete.

A C típusú Niemann-Pick betegség

A C típusú Niemann-Pick betegség (NPC) egy autoszómális recesszív lizoszomális tárolási betegség amelyet az *NPC1* vagy *NPC2* génekben bekövetkező mutációk

okoznak. Széles tünetpektrummal bír, a számos aspecifikus tünet miatt nagyon nehéz diagnosztizálni. Születéstől kezdve lehetnek tünetei, de manifesztálódhat késői felnőttkori krónikus neurodegeneratív betegség formájában is. A génmutációk abnormális késői endoszomális -lizoszomális koleszterin transzport defektust okoznak, aminek az eredménye az lesz, hogy többféle lipid molekula akkumulálódik a lizoszómákban. Az életkilátások a betegség tüneteinek jelentkezésétől függenek. A betegség incidenciája 1:100.000 élveszületés. A betegséget több mint 95%-ban az *NPC1* génben bekövetkező mutációk, míg a maradék 5%-ban az *NPC2* génben bekövetkező mutációk okozzák. Az eredetileg Gaucher kórban használt miglustat gyógyszer potenciálisan NPC kezelésére is használható. Mivel késlelteti a neurológiai tünetek progresszióját, alkalmazását NPC betegségben számos országban befogadták. Minden olyan esetben ahol az NPC diagnózis klinikailag felmerül, az *NPC1* és *NPC2* gének vizsgálata szükséges. Fontos a család nem érintett tagjai hordozó állapotának meghatározása, valamint a prenatális diagnosztika lehetősége is. Jelenleg több, mint 700 *NPC1* variánst ismerünk, amelyek között 475 igazoltan patogén.

A Duchenne/Becker izomsorvadás

A Duchenne izomsorvadás a leggyakoribb izomsorvadás típus, X kromoszómához kötött, incidenciája 1:5.000 fiú születésre nézve. A betegségben tipikus a proximális izomgyengeség, amely korai gyermekkorban mutatja először a tüneteit. A szérumban kreatin kináz (CK) emelkedett. A betegek nagy része 12 éves korra tolószékbe kényszerül, a kardiális manifesztációk dilatatív cardiomyopathia és különböző arhythmia-k lehetnek. Az átlag életkor a diagnózis idején 5 év. A hosszú diagnosztikai késedelem rövidítése fontos a reprodukzív döntéshozatal támogatása miatt. A Becker izomsorvadás allélikus betegség, azonban lényegesen jóindulatúbb, mint a Duchenne, sokkal későbbi kezdettel és jobb életkilátásokkal. A betegség a *dystrophin (DMD)* gén mutációk következményeképpen alakul ki. A *DMD* a humán genom legnagyobb génje, a dystrophin fehérjét kódolja, melynek funkciója a sarcolemma mechanikai megerősítése. A mutációk 1/3-a *de novo*. A genetikai tesztelés első lépése az MLPA analízis, hiszen a betegek 2/3-a deléción/duplikáción alapuló betegségben szenved, míg azok negativitása esetén DNS szekvenálással lehet vizsgálni a kis genetikai eltéréseket a génben. Az új generációs szekvenálási technika nagymértékben javította az analitikai szenzitivitást. A genetikai tanácsadás nagy jelentőséggel bír, hiszen a

mutáció *de novo* vagy öröklött voltát meg kell állapítani, mert az ismétlődési kockázat megítélésében ez rendkívül fontos.

Neonatális diabetes mellitus

A neonatális diabetes mellitus (NDM) egy súlyos monogén betegség, amely definíció szerint az élet első 6 hónapjában keletkezik. Lehet permanens (PNDM) vagy tranziens (TNDM). Az utóbbi esetében a diabetes néhány hónapon belül elmúlik, de később az élet során visszatérhet. A NDM incidenciája 1:100.000-1:400.000 élve születés, az esetek fele PNDM a másik fele TNDM. A neonatális diabetes mellitus esetek kb. felét az K_{ATP} csatorna gének, a SUR1-et kódoló *ABCC8*-ban és a $K_{ir6.2}$ -t kódoló *KCNJ11*-ben bekövetkező mutációk okozzák. A PNDM leggyakoribb oka a *KCNJ11* génben bekövetkező aktiváló mutációk melyek az esetek 30 %-áért felelősek. Szintén funkciónyerő mutációk vezetnek T/PNDM-hoz az *ABCC8* génben. E mutációk ebben a két génben felelősek a PNDM esetek összességében több, mint 40%-áért. A NDM-ban a magas dózisu sulfonilurea (SU) gyógyszeres kezelés rendkívül jó glükóz kontrollt tesz lehetővé.

Fiatal felnőttkori diabetes (maturity-onset diabetes of the young, MODY)

A fiatal felnőttkorban jelentkező MODY öröklődése autoszomális domináns, a betegség korai fázisában nincs inzulindeficiencia. A MODY betegek kb. 80%-a félrediagnosztizálásra kerül, akár 1-es akár 2-es típusú diabetesnek és a korrekt - általában a molekuláris tesztelést is magában foglaló - diagnózisig akár 10 év is eltelhet. A genetikai diagnózis a MODY altípustól függően a betegek nagy részénél az alkalmazott kezelés megváltoztatását eredményezi. A MODY-nak tucatnyi altípusa van.

A hypoglycaemiás hyperinsulinismus

A hypoglycaemiás hyperinsulinismus (HH) egy klinikailag, genetikailag és morfológiailag heterogén betegségecsoport, mely háttérében minden esetben nem megfelelően szabályozott inzulin szekréció áll. A legsúlyosabb és leggyakoribb neonatális formája esetén, a gyors diagnózis kritikus a megfelelő terápiás beavatkozás megválasztása céljából. A HH genetikai formái az inzulin szekréciót szabályozó gének mutációi következtében alakulnak ki. A megfelelő terápia megválasztása a különböző

neurológiai tünetek és a neurológiai fejlődési rendellenességek megelőzése szempontjából fontos. A HH-nak hisztológiailag három formája különíthető el, a diffúz, a fokális és az atípusos forma (ez esetben csak bizonyos szigetsejtek mutatnak hiperpláziás jeleket). A diffúz forma az összes pancreas β sejtet érinti, míg a fokális formánál egy kisebb régió érintett. A fokális HH általában sporadikus és egy apai oldalról öröklött K_{ATP} csatorna gén mutációval jár együtt. Az összes HH eset 60%-a diffúz. Ekkor általában egy homozigóta recesszív mutáció vagy összetett heterozigóta mutáció kombináció áll a háttérben. Ezek a betegek általában gyógyszeres terápiára nem reagálnak, így esetükben a majdnem teljes pancreas eltávolítás az egyedüli megoldás. A HH monogénis nem szindrómás forma 12 gén hibájára vezethető vissza. Sok esetben a genetikai háttér feltárása még mindig sikertelen. A mutációk leggyakrabban a K_{ATP} csatornát alkotó fehérjék membránba jutását akadályozzák meg, vagy aktivitásukat csökkentik le drasztikus módon.

Genetikai diagnosztikai módszertani fejlesztések

A klinikai laboratóriumi genetikának ritkán adatik meg, hogy előregyártott, optimalizált, CE-IVD eszközökkel dolgozzon a diagnosztikai eljárás során. Ennek következménye a számos módszertani fejlesztés, optimalizáció, melyek nagy része a specifikus diagnosztikai esetek/kohorszok fejezetekben kerül bemutatásra. Itt azt a két esetet mutatom be, amely általános jelentőséggel bír, hiszen minden, a területen végzett diagnosztikai eljárás során van szerepe. Az egyik módszertani fejlesztés az anyai kontamináció vizsgálata prenatális mintavételt követően, a másik pedig a pirosekvenálás analitikai teljesítőképességének analízise, különös tekintettel a homopolimer szakaszok vizsgálatára.

Az anyai sejt kontamináció hatása a molekuláris genetikai diagnosztikai tesztekre invazív mintavételt követő prenatális diagnosztika során

A prenatális diagnosztika fő terepe jelenleg még mindig az invazív prenatális diagnosztika. Az anyai sejt kontamináció az invazív beavatkozással nyerhető, a chorion biopszia (chorionic villus sampling, CVS) és a magzatvíz mintákban kimutatható és mind a két esetben súlyos preanalitikai kockázati tényezőt jelent. A prenatális diagnosztika során végzett genetikai tesztelés minősége nagymértékben függ az anyai kontaminációtól (maternal cell contamination, MCC). Az anyai sejt kontamináció rossz

diagnózishoz vezethet tragikus terhességi következményekkel, valamint nem konkluzív eredményre, utóbbi miatt szükség lehet egy megismételt invazív beavatkozásra. Az magzatvízhez képest a CVS magasabb anyai sejtkontaminációs kockázattal bír, mert az anyai deciduát a magzati sejtekről nehéz teljes mértékben eltávolítani. Az elfogadott ajánlás alapján, minden egyes prenatalis diagnosztika esetében ajánlott anyai sejt kontaminációs vizsgálatot végezni. A genetikai laboratóriumnak tisztában kell lenni a rutin módon alkalmazott diagnosztikai tesztek anyai sejt kontaminációra vonatkozó szenzitivitásával, mely szükséges a teszt eredményének korrekt interpretációjához, azonban ennek a kialakítása nagyon nehéz és a nemzetközi adatok is hiányosak.

Piroszekvenálási alapú új generációs DNS szekvenálási rendszer analitikai paramétereinek vizsgálata

A homopolimer (HP) egy olyan szekvencia mintázat, amely azonos nukleotid bázisokból áll, majdnem minden exonban előfordulnak. Legnagyobb részük 4-6 nukleotid hosszú. A napjaink klinikai laboratóriumi genetikai diagnosztikájában használt új generációs szekvenálási technológiák esetében néhány nem képes a homopolimereket megfelelően szekvenálni a szekvenálás alapelve miatt. A piroszekvenálás és az ion félvezető szekvenálás esetében a jel - ami emittált fény vagy hidrogén ionok - erőssége attól függ, hogy hány azonos nukleotid bázis épül be a DNS szálba egy adott dNTP ciklus során. Azonban az induló linearitás a HP mintázatokban egyre inkább ellaposodik, ebből következően számos, mind túl sok, mind túl kevés nukleotid olvasásban megvalósuló hiba következhet be. Ami ezt különösen problémássá teszi, hogy a HP szekvenciák az inzerció és delécio mutációk forró pontjaiként szerepelnek, ezért ezeknek a módszereknek a klinikai laboratóriumi genetikai diagnosztikai felhasználása a HP szekvenciák tekintetében kérdéses. Kevés experimentális adat áll rendelkezésünkre arra nézve, hogy mennyi az a pontos HP nukleotid szám, ahol a piroszekvenálás pontatlanná válik. Vizsgálatára két tesztrendszer alakítottunk ki: plazmid vektorokban különböző homopolimereket hoztunk létre és ezeket szekvenáltuk új generációs szekvenálással, valamint a *CFTR* gént vizsgáltuk egy saját fejlesztésű piroszekvenálási tesztrendszerrel ismert szekvenciájú betegmintákon.

Monogénes kohorszok vizsgálata

A monogénes kohorszok genetikai vizsgálatának jelentősége szerteágazó. A mutációk ismerete lehetőséget nyújt pontos, költséghatékony diagnosztikai protokollok kialakítására, segítheti a reprodukzív döntéshozatalt. A családoknak megnyugvást hozhat, rövidíti a diagnosztikus odüsszeiát. Adatokat szolgáltat a populáció történetére, a genotípus-fenotípus kapcsolatra vonatkozóan, segítheti az újszülöttkori szűrés genetikai oldalának kidolgozását. Munkánk során négy monogénes kohorsz analízisét végeztük el.

A cystás fibrosis (CF)

A cystás fibrosis (CF) a kaukázusi népcsoport egyik leggyakoribb súlyos monogénes betegsége. Öröklődésmenete autoszomális recesszív. A betegek várható élettartama 40 év. Számos országban a CF immunreaktív tripszinogén (IRT) alapú szűrése bekerült az újszülöttkori szűrőprogramokba, habár a szűrés ellentmondásos, hiszen a CF a legutóbbi időig az összes Wilson és Jungner kritériumnak nem felelt meg, elsősorban azért, mert nincsen olyan kezelési módja, amely érdemben befolyásolná a fenotípus kialakulását és progresszióját. Évtizedeken át csak tüneti kezelés volt lehetséges, ami elsősorban a légutakban kialakuló viszkózus nyák oldását jelentette, illetve az antibiotikum kezelés, amely az infekciók megelőzésére és kezelésére szolgál. A betegség által érintett fehérje a CFTR (cystic fibrosis transmembrane regulator) egy, elsősorban a légutakban és a verejték mirigyekben expresszáldó klorid ion csatorna. A betegség diagnosztikáját megnehezíti az a tény, hogy a fehérjét kódoló *CFTR* génben több, mint 2000 mutáció okozhat CF-et és az egyes mutációk előfordulása igen változó a különböző vizsgált populációkban. A CF mutációk hazai prevalencia adatai igen hiányosak voltak az ezirányú munkánk megkezdése előtt. A funkcionális defektus tulajdonságainak megfelelően 7 mutációs osztályt különböztetünk meg CF esetében. Az I. osztályú mutációk esetében fehérje nem keletkezik. A II. osztályú mutációk (ide is tartozik a leggyakoribb CF mutáció, a p.Phe508del) a CFTR fehérje érését befolyásolják és a végeredménye az lesz, hogy a fehérje csomagolódása sérül, a mutáns fehérje korai degradációval elemésztdik. A III. osztályú mutációk esetében a CFTR csatorna nyitási funkció érintett, míg a IV-es osztályú mutációk esetében a klorid vezetés csökkent. Az V. osztályú mutációk esetében a CFTR fehérje mennyisége csökkent. A VI. osztályú mutációk a citoplazma membránban levő CFTR életidejét

csökkentik. A VII. osztályú mutációk esetében a farmakológiai kezelésnek elvi lehetősége sincsen, hiszen oly mértékben sérül a genetikai állomány, hogy semmilyen formában nem alakulhat ki működőképes fehérje. Ilyen eltérések a nagy CNV-k. A mutáció specifikus terápiák alapja olyan kis molekulású modulátor molekulák, amelyek feladata az, hogy valamilyen módon javítsák a mutáns CFTR fehérje funkcióját. A potenciátorok a csatorna nyitási valószínűségét növelik meg, a korrektorok az átíródó CFTR fehérje plazma membránba való kijutását segítik elő, a stabilizátorok meghosszabbítják a mutáns CFTR fehérje plazma membránban eltöltött idejét, az amplifikálók megnövelik a mutáns CFTR mennyiségét ahhoz, hogy utána más kis molekulák tudjanak rajta hatni és vannak a nonszensz mutációk kezelésére szolgáló átolvasó gyógyszerek. A modulátorok két osztálya kapott már szabályozási hatóságtól engedélyt: a potenciátorok, amely esetében a nyitási és a vezetési hibát okozó *CFTR* mutációkat lehet kezelni, valamint olyan variánsoknál, ahol van reziduális funkció és az bizonyítottan javul a potenciátor kezelés hatására, a korrektorok, amelyeknek az érést elősegítő funkciójuk a potenciátorokkal együtt értelmezhető, azaz együtt fogják a p.Phe508del homozigóta betegeknél vagy a p.Phe508del/más mutáció összetett heterozigóta betegek esetében javítani a klinikai képet.

A Smith-Lemli-Opitz szindróma

A Smith-Lemli-Opitz (SLO) szindróma egy monogénes, autoszomális recesszív módon öröklődő, mentális retardációval járó malformációs szindróma. A biokémiai eltérések (emelkedett 7-dehidrokoleszterin (7-DHC)) hátterében a koleszterin bioszintézis utolsó lépését katalizáló enzim, a 7-dehidrokoleszterin-reduktáz (DHCR7) defektusa áll. Az enzimblokk eredményeképpen alacsony koleszterin szint, magas 7-DHC koncentráció mérhető a vérben és a szövetekben. A koleszterin embrionális fejlődésben és morfogenezisben játszott szerepe hozzájárul az SLO kialakulásához. A kórképre jellemző, több szervrendszert érintő, szerteágazó tünetekért - más veleszületett anyagcsere betegségekhez hasonlóan - az enzimblokk előtt felszaporodó közti termék, a 7-DHC valamint a csökkent mennyiségű végtermék, a koleszterin együttesen felelősek. A 7-DHC sejtmembránba való beépülése megváltoztatja a lipid raftok protein összetételét, a sejtmembrán struktúráját. Az emelkedett koncentrációban lévő 7-DHC és annak metabolitjai ugyanakkor toxikus hatásúak, mert a 7-DHC könnyen oxidálható lipid molekula. A lipid peroxidáció során számos oxiszterol keletkezik belőle, melyek

feltételezhetően kóroki szerepet játszanak a szindrómában megfigyelhető központi idegrendszeri tünetek kialakulásában. Becsült incidenciája 1:10.000-1:70.000. A magas hordozó gyakoriságot (1:30) alapító hatással és a heterozigóták szelekciós előnyével magyarázzák. Utóbbiban szerepet játszhatott a D-vitamin fokozott keletkezése a bőrben lévő előanyagából, a 7-DHC-ből, amely nemcsak az angolkór kialakulásával, hanem az autoimmun betegségek fellépésével és bizonyos kórokozókkal szemben is védettséget jelent. A hordozó gyakoriság alapján becsült incidencia magasabb, mint a tényleges, ami a súlyosan érintett magzatok prenatális/perinatális elhalálózásából, illetve a betegség aluldiagnosztizáltságából és a hordozók csökkent fertilitásából adódhat. Az SLO szindróma széles klinikai spektrummal rendelkezik. A fenotípusos jegyek, az egészen enyhe tünetektől (viselkedési zavar, enyhe mentális retardáció) a prenatális/perinatális elhalálózáshoz vezető több szervrendszert érintő rendellenességek jelenlétéig, rendkívül változatosak lehetnek. A különböző szervrendszerek érintettsége alapján a betegség három súlyossági fokozata különíthető el: enyhe (<20 pont), típusos/klasszikus (20-50 pont) és súlyos (>50 pont). Az SLO szindrómás betegeket többnyire fejlődésbeli elmaradás jellemzi. A mentális retardáció változó mértékű lehet. Gyakori a szenzoros hiperreaktivitás, a különböző vizuális, auditoros ingerekre adott felfokozott válaszreakció. A betegek többségére jellemző különböző mértékű agresszivitás és önbántalmazás. Jellemző a súlyos alvászavar. A klinikai tünetek alapján felmerülő SLO szindróma esetén elsőként biokémiai tesztek elvégzésére kerül sor. Az SLO szindróma kialakulásáért a DHCR7 enzimet kódoló gén mutációi felelősek. A mutációk a génben bárhol előfordulhatnak, jelenleg 169 SLO szindrómát okozó mutáció ismert. Más monogénes betegségekhez hasonlóan itt is megfigyelhető, hogy az egyes populációkban különböző a mutációs spektrum és az egyes mutációk gyakorisága földrajzi elhelyezkedéstől függően eltérő. SLO szindróma esetén a genotípus-fenotípus összefüggés gyenge korrelációt mutat, kivétel, hogy a legsúlyosabb klinikai kép (akár magzati vagy perinatális halálózás) két null allélt eredményező mutáció esetén fordul elő, mely genotípus az enzimaktivitást közel nullára csökkenti. A gyakori összetett heterozigótaság és az azonos genetikai háttérű betegek alacsony száma nehezíti a genotípus-fenotípus összefüggések vizsgálatát. Amennyiben a családra jellemző mutáció ismert, ismételt terhesség alkalmával prenatális genetikai diagnosztika lehetséges. Az SLO szindrómás betegek kevesebb koleszterint szintetizálnak és az enzimblokk miatt jelentősen emelkedik a vérben és a

szövetekben a 7-DHC szintje. Az elsődleges terápiás próbálkozás a koleszterin szint növelését célozza. A koleszterin pótlás a legtöbb beteg esetén emeli a koleszterin koncentrációt a vérben. A koleszterin azonban a vér-agy gáton nem jut át, így az agyban nem tudja a koleszterindeficitet, valamint a már kialakult központi idegrendszeri eltéréseket korrigálni. A másik kezelési mód a HMG-CoA reduktáz gátló sztatínok alkalmazása, melyek átjutnak a vér-agy gáton és paradox módon a reziduális *DHCR7* aktivitás növekedését okozva egyes SLO szindrómás betegekben a koleszterin szint emelkedéséhez, illetve a 7-DHC csökkenéséhez vezetnek. A 7-DHC-ből lipidperoxidációs folyamatok során számos oxiszterol keletkezik, mely terápiás szempontból az antioxidánsok potenciálisan előnyös hatását feltételezi. Az E-vitamin gátolja a 7-DHC-ből az oxiszterolok képződését. Minden olyan próbálkozás, ami a toxikus 7-DHC szintet csökkenti, potenciális kezelési lehetőségként vizsgálendő. Nemzetközi kollaborációban végzett vizsgálataink során amerikai partnerünk több olyan kis molekulát azonosított, melynek hatása van a koleszterin bioszintézisre. A hordozók enyhén emelkedett 7-DHC szinttel rendelkeznek. Kollaborációs partnerünk korábbi munkáiból tudjuk, hogy az emelkedett 7-DHC szint heterozigóta egerekben is kimutatható és a legmagasabb szinteket pedig az idegrendszerben találták, valamint az is bizonyítást nyert, hogy bizonyos pszichiátriai betegek, akik aripirazole vagy trazodone gyógyszert szednek, nagy mértékben megemelkedett 7-DHC-val rendelkeznek. Az aripirazole vagy trazodone gyógyszert szedők esetében a 7-DHC plazma szintjük alapján akár az SLO félrediagnosztizálás veszélye is fennáll. Az adatok arra utalnak, hogy a *DHCR7* inhibítor expozíciónak hatása lehet a magzati egészségre. Az a tény, hogy a populációban sem a heterozigóták sem az aripirazole-t szedők aránya nem extrém alacsony, esetenként a 7-DHC szint toxikus tartományba emelkedését is felveti.

Az autoszomális recesszív policisztás vesebetegség

A renális ciliopathiák az elsődleges csillót alkotó fehérjék génjeinek mutációjaként alakulnak ki. Ide tartozik többek között az ADPKD (autosomal dominant polycystic kidney disease) és az ARPKD (autosomal recessive polycystic kidney disease), valamint a nephronophthisis is. A policisztás vesebetegségek leggyakoribbja az ADPKD, ami általában egy felnőttkorban jelentkező több szervi érintettséggel rendelkező betegség, előfordulása 1:400 és 1:1000 élve születés közé tehető, azaz az

ADPKD több mint 10 millió embert érint a világon. A betegek több, mint 90%-ában a *PKD1* és *PKD2* gének mutációja okozza a betegséget. Az ARPKD sokkal ritkább, de sokkal súlyosabb betegség, mint a domináns forma. Tipikusan perinatálisan vagy gyermekkorban manifesztálódik, gyakran végzetes következményekkel. A betegség érintheti a májat is, máj fibrosist okoz és nagy mértékben megnagyobbodott vesékkel jár. Az ARPKD kombinált máj és vese transzplantációt igényelhet gyermekkorban. A betegséget okozó génmutáció a *PKHD1* génben van, amely gén a fibrocisztin/polyductin nevű fehérjét kódolja és ez a protein az elsődleges csillóban és a bazális testben fordul elő. A fibrocisztin részt vesz a sejt-sejt adhézióban és proliferáció szabályozásban is, illetve lehetséges az, hogy egy membrán kötött receptorként is funkcionál. A *PKHD1* gén rendkívül nagy méretű. Az ARPKD incidenciája 1:26.500 élve születés. Pontos incidenciájának megbecslése nehéz, hiszen a különböző kohorszok esetében különbözőek a beteg beválasztási kritériumok és sokszor előfordul az, hogy a perinatálisan elvesztett definitív diagnózis nélküli újszülöttek esetében nem történik mutáció analízis. Az ARPKD 30-40%-os mortalitása a tüdő hypoplasia-ra vezethető vissza. Az ARPKD esetében is egy genetikailag homogénnek gondolt betegségről van szó, amely a *PKHD1* génben történő recesszív mutációk következtében alakul ki, de vannak már egyéb más olyan újonnan identifikált gének, mint pl. a *DZIP1L*, amelyek okozhatják a betegséget. A *PKHD1* gén által okozott ARPKD genotípus-fenotípus korrelációját rendkívül nehéz felállítani. Sok összetett heterozigóta genotípus is megfigyelhető, mely esetekben a két különböző mutáns allél hatása nehezen vizsgálható, de általában a hypomorf allél determinálja a fenotípust, hiszen a funkcióvesztő allél jelenléte egyértelműen súlyos következményekkel jár. Azokban az esetekben, ha két trunkáló mutáció van jelen, akkor a betegség igen súlyos, általában halálos. Az aminosav cserékkel járó mutációk esetében előfordulhat a trunkáló mutációknak megfelelő, de enyhébb fenotípus is. A definitív diagnózis felállítása lélektanilag nagyon fontos a családoknak, a diagnózisnak lehet szerepe az extrarenális tünetek meghatározásában, a komplikációk előrejelzésében. A teljes exom szekvenálás módszertanának széleskörű elterjedése segíti a nagymértékben átfedő fenotípussal rendelkező ciliopathiák diagnózisát. Hagyományosan a *PKHD1* gén tesztelése Sanger szekvenálással történt, de ennek szerepét ma már átveszi az új generációs szekvenálás. A genetikai tesztelés a családok 95%-ban legalább egy mutációt talál. Bizonyos mutációk gyakrabban előfordulnak

minden populációban mint mások, pl. a p.Thr36Met misszensz mutáció amely az európai betegpopuláció 10-15%-ban kimutatható. A *PKHD1* mutáció hordozó szülők esetében, akiknél a családban volt már beteg gyermek, a prenatális diagnosztika lehetséges. Jelen lehetnek fenokópiák is. A differenciál diagnózis során a nephronophthisis, a korai jelentkező ADPKD illetve az ARPKD veendő elsősorban figyelembe. Ezekben az esetekben a vese ultrahang vagy egyéb képalkotó eljárások segíthetnek, de végleges diagnózist a genetikai vizsgálat jelent. A különböző formák közti különbségtétel kritikus a genetikai tanácsadás a reprodukív tervezés szempontjából és a betegség kilátásai szempontjából is.

A Marfan szindróma

A Marfan szindróma az *FBN1* génben bekövetkező mutációk miatt alakul ki, az érintett fehérje a fibrillin-1, az extracelluláris mátrix fontos alkotó eleme, mely strukturális integritást ad a kötőszövetnek és hozzájárul elasztikus tulajdonságainak kialakításához is. A Marfan szindróma szövődményei az aortagyök aneurysma disszekció és a mitrális billentyű prolapszusa. A Marfan szindróma genetikai diagnosztikája nagy hatással van a betegség menedzsmentjére, mert a diagnózis megelőző sebészeti beavatkozáshoz vezet abban az esetben, ha az aortagyök átmérője eléri az 5 cm-t, vagy ha az aortagyök növekedése évente nagyobb, mint 5 mm. A nagyon gyakran már gyermekkorban kimutatható és fontos diagnosztikai kritériumként szereplő mitrális és tricuspidális billentyű prolapszus hosszú távú klinikai követést igényel, évente echocardiogram ajánlott. A Marfan szindróma az életminőséget nagymértékben rontja. A fő mortalitási ok az aorta komplikáció, ami a Marfan szindrómás betegek 80%-ánál kialakul. A legsúlyosabban érintett, neonatális Marfan szindrómás betegeket már születéskor diagnosztizálják. A korai felismerés javíthatja a menedzsmentet és a genetikai tanácsadás során tájékoztathatók a szülők az esetleges kimenetelekről. A súlyos állapotú újszülöttek esetén a mortalitás az első életévben elérheti a 15%-ot. A neonatális Marfan szindróma súlyos mitrális és/vagy tricuspidális billentyű elégtelenséggel és pulmonális emphysemával jár. A mutációk kettős hatásúak. Ha a fibrillin-1 nem funkcionál, annak nemcsak szerkezeti következménye van, de a TGF- β szignalizációs útvonal túlzott aktivitása is, és mindkettő hozzájárul az egyébként meglehetősen bonyolult patogenezishez. A Ghent kritérium rendszer nagyon hangsúlyozza a genetikai tesztelés fontosságát a szemészeti és kardiovaszkuláris tünetek mellett. A

Ghent nozológiát vizsgálataink során mi is használtuk. A családi halmozódás hiányában az aorta gyök tágulat és az ectopia lentis önmagában felállítja a Marfan szindróma diagnózisát, míg ha csak egy ilyen manifesztációja van, akkor a *FBNI* patogén mutáció jelenléte vagy a $7 \geq$ szisztémás pont érték az, ami szükséges ahhoz, hogy a diagnózis felálljon. Pozitív családi anamnézis esetén ectopia lentis, a $7 \geq$ szisztémás pont érték vagy a kitágult aorta elegendő a Marfan szindróma diagnózisának felállításához. A Marfan szindróma prevalenciája 1:5000 és 1:10.000 közé tehető. A Marfan szindrómás betegek 75%-a esetében mutatható ki családi halmozódás (érintett szülő), 25% pedig *de novo* mutáció eredményeképpen alakul ki. A nagy méretű *FBNI* gén 230 kb-t foglal magába, 66 exont tartalmaz és eddig kb. 2400 különböző patogén mutációt írtak le, amelyek a teljes régióban előfordulnak. A 25-33-as exonig terjedő rész - ahol a cb-EGF domének vannak - kritikus régió a súlyos neonatális Marfan szindrómát illetően. Ugyan a penetrancia komplett, de mivel rendkívül nagy variabilitás van mind családok között, mind családon belül ugyanazon mutáció esetében is. A mutációk 2/3-a misszensz mutáció. A Marfan szindróma klinikai laboratóriumi genetikai tesztelési stratégia első lépése a szekvenálás, amelyet CNV analízis követ abban az esetben, ha kis skálájú variáns nem mutatható ki. Az *FBNI* szekvencia analízis Marfan szindróma esetén 90-93%-ban pozitív. A patogén variánsok több mint 90%-a egyedi. Lehetőség van prenatális és preimplantációs genetikai diagnosztikára is. A preventív sebészeti eljárások nagy előrelépést jelentenek a legfontosabb komplikáció kivédése szempontjából. A terhesség menedzsment fontos, hiszen a Marfan szindrómás nők esetében a terhesség alatt 3 mm-el nő az aorta átmérő és az alap kockázathoz képest az aorta komplikációknak veszélye ötszörösére növekszik. Marfan szindrómás terhes nők esetében az aorta disszekció közvetlenül a szülés után nagyon nagy kockázatú.

Multifaktoriális betegségek vizsgálata

A multifaktoriális kórképek genetikai, laboratóriumi vizsgálatai több évtizedes múltat tekintenek vissza, elég, ha a leggyakrabban végzett - ellentmondásokról nem mentes - genetikai tesztre, a faktor V Leiden mutációra gondolunk. A nagy populációt érintő betegségek kialakulásának megakadályozása, a kezelési lehetőségek genetikai alapon történő alkalmazása és fejlesztése számos esetben bizonyították helyüket a medicinában. A multifaktoriális kórképek vizsgálata során előfordulhat, hogy ki kell lépni a genetikai módszertanból, és szélesebb körű metodológiát kell alkalmazni.

Munkám során korábban már vizsgáltam thrombosis genetikai hátterét szerteágazó módszertani megközelítéssel, ezt a szemléletet próbáltam alkalmazni a Gas6 vizsgálatok során. A komplex betegségek genetikai analízisét kiterjesztettük két kifejezetten nagy népegészségügyi problémára, az időskori macula degenerációra és férfi infertilitásra is.

A Gas6 és receptorai

A Gas6 fehérje az azonos nevű génnek a terméke. Multimoduláris K-vitamin függő fehérje, nagy homológiát mutat a véralvadás szabályzó fehérjéjével, a protein S-sel. Expressziója széleskörű, expresszálódik az endotheliális sejtekben, a vasculáris simaizomsejtekben, a csontvelőben. A Gas6 három különböző receptor tirozin kináz ligandja (Tyro-3, Axl, MerTK (TAM család)). A receptor-ligand kötéskor a receptor dimerizálódik, autofoszforilálódik az intracelluláris tirozin kináz doméneken. A Gas6 számos élettani folyamatban játszik szerepet, beleértve a sejt migrációt, adhéziót, a sejt növekedését és túlélését. A Gas6 aktivitás γ -karboxilációt igényel. A TAM család tagjai olyan egyes típusú transzmembrán receptor tirozin kinázok, melyek nagy funkcionális homológiát mutatnak onkogenitás, apoptotikus sejtek eltávolítása és a veleszületett immunitás szabályozása szempontjából. A Gas6 számos különböző betegség etiológiájának részese lehet, mint a rheumatoid arthritis, nephrotoxikus nephritis és emlődaganat. A Gas6-nek lehet szerepe az inzulinrezisztenciában, a kettes típusú diabetesben és a gyulladásban is. Az emelkedett Gas6 szint kapcsolatba hozható vénás thromboemboliás betegségekkel, diabeteses nephropátiával és idiopathiás ismétlődő vetéléssel is. A Gas6 szint emelkedett lehet gyulladásos állapotokban, mint szepszisben, SLE-ben. Különösen érdekes a *Gas6* egy introni polimorfizmusa, a c.834+7G>A. A *Gas6* c.834+7G>A SNP-nek a kettes típusú diabetesben betöltött potenciális patogenetikai szerepét illetően azt találták, hogy az AA genotípus védő hatású kettes típusú diabetes-szel szembeni ki. A Gas6 KO egér mind arteriás mind vénás thrombosisból védettnek bizonyult. Céлом volt a Gas6 esetében a genetikai meghatározottságot fehérjeszinten mérni képes kísérleti rendszer(ek) kifejlesztése. Hazatérve a Gas6 munkát immáron ismét DNS szinten folytatva, jelölt gén analízissel egy eset-kontroll tanulmány keretében vizsgáltuk a *Gas6* c.834+7G>A SNP esetleges hatását az időskori macula degenerációra nézve.

Időskori macula degeneráció (age-related macular degeneration, AMD)

Az AMD a retina középső, az éles látásért felelős területét, a maculát érintő komplex progresszív betegség. Kialakulásához három fő tényező járul hozzá. A kor előrehaladtával a kockázat nő, jelentős a környezeti faktorok (dohányzás, oxidatív stressz) valamint a genetikai kockázati tényezők szerepe. A korai és köztes AMD állapotokban tipikus a lipidekben és fehérjékben gazdag depositumok, az úgynevezett drusenek megjelenése, diagnózisuk nagy kockázatot jelent arra, hogy a betegség tovább fejlődik és kialakul a késői AMD, ami száraz vagy nedves típusú lehet. A száraz típus esetében úgynevezett geográfiai atrophia mutatható ki, fotoreceptor vesztés és egy kifejezett retinális pigment epithelium atrophia figyelhető meg. A nedves változat esetében neovascularizáció figyelhető meg. Amikor ezek az erek eltörnek, a vér a retinába jut és látásvesztést eredményez. A neovascularizáció az AMD esetek 15-20%-ában mutatható ki, mégis sokkal súlyosabb forma, a látásvesztésért nagyrészt ez felel. A betegség következménye a centrális látás elvesztése. Az AMD a fejlett országokban az időskori vakság vezető oka, 2020-ban már majdnem 200 millió embert érint a világon. A terápiás beavatkozási lehetőségek korlátozottak, a leginkább kezelhető változat a késői exudatív forma, ahol a kezelés az intravitreális anti-vasculáris endotheliális növekedési faktor (anti-VEGF) terápia. A száraz korai vagy késői AMD esetén jelenleg nincsen olyan kezelési mód, amely a kórfolyamatot megállítaná vagy visszafordítaná. Addig amíg 1997-ben egy genetikai predisponáló gén volt ismert, ma már harmincnál is több olyan egymástól független lókuszt ismerünk, amelyek az AMD kialakulásához vezethetnek. Az AMD genetikai okainak feltárásában 2005-ben történt óriási előrelépés, amikor egymástól függetlenül több tanulmány igazolta a komplement faktor H (*CFH*) egy polimorfizmusának az összefüggését az AMD kialakulásával. Komplement-asszociált gének polimorfizmusait számos esetben összefüggésbe hozták AMD-vel. Vannak azonban más, a komplement rendszertől független gének is amelyek szerepet játszanak az AMD kialakulásában, mint pl. az *LOC387715/HTRA1* lókuszt. Más AMD-vel kapcsolatba hozott gének érintik az angiogenezist, az extracelluláris kollagén mátrixot és a lipid metabolizmust. Az AMD, mely tipikus példája a későn manifesztálódó multifaktoriális betegségeknek, számos genetikai komponenssel bír, így minden olyan adat, ami a genetikai diagnosztikában felhasználható, legyen az a kezelés hatékonyságának megbecsülése, a genetikai háttér feltárása, beleértve a poligénes kockázat meghatározását, klinikai hasznossággal bírhat. Célunk volt az

esetleges magyar populáció-specifikus sajátosságok feltárásán túl a korábban mások által nem vizsgált *Gas6* c.834+7G>A polimorfizmus asszociációjának felmérése.

Az infertilitás, mint multifaktoriális kórkép genetikai meghatározottsága

Az infertilitás valódi népegészségügyi probléma, a gyermeket vállalni kívánó párok 14%-át érinti és az esetek feléért a férfi oldal a felelős. Multifaktoriális kórkép, melynek heterogén fenotípusos megjelenései lehetnek. A nagy genetikai eltérések közül megemlítendő a kromoszómák számbeli és struktúrális eltérése, illetve az Y kromoszóma mikrodeléciók, melyek 15%-ban mutathatók ki a súlyos férfi infertilitás esetek hátterében. A monogénes okok sokkal szerteágazóbbak, de rutin genetikai tesztelésük sokkal korlátozottabb. Az Y kromoszóma olyan géneket tartalmaz, amelyek a here fejlődéséhez és funkciójához elengedhetetlenek, ilyenek pl. az AZF régióban levő gének illetve az *SRY* gén. Az AZF régiót deletáló Y kromoszóma mikrodeléciók a spermatogenezis hibájának fontos okai. Az obstrukciós eredetű infertilitás leggyakoribb oka a CF.

A mikroRNS-ek olyan rövid, 20-23 nukleotidból álló rendkívül konzervált egyszálú nem kódoló RNS molekulák, amelyek gén expresszió szabályozásban vesznek részt. Ez a szabályozás poszt-transzkripcionális szinten történik meg, a cél mRNS-ek 3' le nem fordított szakaszához történő kötődéssel és a mRNS degradációjának vagy translációs repressziójának következményével. Egy miRNS több 100 cél mRNS szabályozásában vehet részt, míg egy mRNS-nek is több miRNS kötőhelye lehet. Ennek megfelelően a miRNS-ek számos élettani folyamatot szabályoznak, legyen az proliferáció, differenciáció, fejlődés, apoptózis. Ellentétben az mRNS-sel a miRNS-ek rendkívül stabilak a különböző testfolyadékokban, miRNS-eket megtalálták a spermiumokban, az ondóban és a here szövetben is. Több vizsgálat történt a miRNS-ek férfi infertilitással történő kapcsolatának feltárására. A miRNS expressziós mintázatban való eltérést kapcsolatba hozták a spermatogenezis hibáival (asthenozoospermia, oligozoospermia) és feltételezik azt is, hogy a férfi infertilitás biomarkereiként is funkcionálhatnak.

CÉLKITŰZÉSEK

1. Súlyos, az életminőséget nagyban befolyásoló monogénes betegségek genetikai okainak feltárása, a személyre szabott kezelés illetve a reprodukciós döntéshozatal támogatása egyedi esetekben. Vizsgáltunk anyagcsere betegségeket (monogénes diabetes, hyperinsulinismus, C-típusú Niemann-Pick betegség), véralvadási zavart (Faktor V deficiencia) illetve a vázizomrendszer megbetegedését (Duchenne/Becker izomsorvadás).
2. Súlyos monogénes betegségek magyarországi mutáció spektrumának felmérése. A genotípus alapú mutáció-specifikus kezelés alapjainak megteremtése, a prenatális diagnosztikai lehetőségek kialakítása. A vizsgált betegségek a cystás fibrosis, a Smith-Lemli-Opitz szindróma, az autoszomális recesszív polycystás vesebetegség és a Marfan szindróma. A Smith-Lemli-Opitz szindróma vizsgálatok kapcsán különböző gyógyszerek koleszterin bioszintézisre kifejtett hatásának vizsgálata.
3. Multifaktoriális betegségek populációs szintű vizsgálata, különös tekintettel a thrombosisra kapcsolatba hozható Gas6 mérési rendszerének kifejlesztésére, az időskori macula degeneráció genetikai komponenseinek vizsgálatára és a férfi infertilitás hátterében álló struktúrális és szabályozási genetikai tényezők vizsgálatára.
4. A klinikai laboratóriumi genetikai diagnosztikai gyakorlatban használt eljárások fejlesztése, optimalizálása és tesztelése. Piroszekvenálási alapon működő új generációs DNS szekvenálási módszer analitikai paramétereinek vizsgálata. Az invazív mintavétellel nyert magzati minta anyai sejt kontamináció diagnosztikai tesztek zavaró hatásának vizsgálata.

BETEGEK, ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Monogénes egyedi esetek vizsgálata

A genetikai vizsgálatokat minden beteg esetében megelőzte a klinikai vizsgálatot követő laboratóriumi/képalkotó diagnosztika.

Faktor V deficiencia: A beteg tünetei újszülött/csecsemőkorban subduralis haematoma és intramuscularis injekciókat követő súlyos haematomák voltak. A laboratóriumi tesztek Faktor V hiányt valószínűsítettek.

Niemann-Pick C: A beteg neurológiai tünetei serdülőkorban jelentkeztek. A splenomegália, a vertikális tekintésbénulás és a folyamatosan visszafejlődő motoros képességek irányították a kivizsgálást Niemann-Pick C irányába. A beteg klinikai diagnózisának felállítója, a kezelés elindítója Dr. Szakszon Katalin volt.

Duchenne/Becker izomsorvadás: A 6 hónapos csecsemő enyhe generalizált izomgyengesége, hypotonia, megkésett motoros fejlődés és az emelkedett szérum CK aktivitás indikálta a genetikai analízist. A beteg klinikai diagnózisának felállítója Dr. Merő Gabriella volt.

Neonatalis diabetes mellitus: A vizsgált eset egy olyan nőbeteg, aki a *KCNJ11* c.685G>A (p.Glu229Lys) mutációval rendelkezett és korábbi klinikai diagnózisa neonatális diabetes volt. Ez 3 és 10 éves életkora között többször remisszióba került, ekkor inzulinterápiát alkalmaztak. Genetikai diagnózisa 13 évesen történt meg, ekkor sulfonylurea terápiára került. 16 évesen terhes lett, az inzulinterápia nem eredményezett megfelelő glükóz kontrollt, így gliclazid kezelést vezettek be. A klinikai vizsgálatok és a beteg menedzsmentje Dr. Gaál Zsolt irányítása alatt történtek.

HNF4A-MODY: A vizsgálatok során két beteget vizsgáltunk, édesanyát és lányát. Az édesanya 20 éves korában gesztációs diabetest diagnosztizáltak, 16 éven keresztül volt inzulin terápián a genetikai vizsgálatok elvégzését megelőzően. Lánya esetében 13 éves korban diabetest állapítottak meg, 6 éven keresztül részesült inzulinterápiában. A családfa felvétele során kiderült, hogy a családban számos diabeteses rokon volt. Az eredmények klinikai értékelését, a családfa analízist Dr. Jermendy György végezte.

Hypoglycaemias hyperinsulinismus: A fiú újszülött esetében egy órás életkorban hypoglycaemia került detektálásra. 6 napos korban a vércukorszint normalizálódott, tranziens hypoglycaemia diagnózist állítottak fel. Két hónapos életkorban került kórházba hypoglycaemiás epizódok miatt, melyek során a plazma glükóz szint 1,1-1,9

mmol/L között ingadozott. A klinikai vizsgálatok és a beteg menedzsmentje Dr. Balogh Lídia irányítása alatt történtek.

Monogénes kohorszok vizsgálata

Cystás fibrosis: A CF diagnózisát az elfogadott klinikai és laboratóriumi kritériumok által állítottuk fel. A betegség genetikai hátterét két tanulmányban vizsgáltuk, összesen 85 beteg esetén.

Smith-Lemli-Opitz szindróma: Összesen 13, az SLO tüneteit mutató beteg mintájának vizsgálatára került sor. Egy beteg az első életnapon, egy másik 12 napos korában légzési elégtelenségben meghalt, három másik beteget két éves kora előtt vesztek el. A vizsgált kohorszban volt két testvér. A legidősebb és egyben legenyhébb fenotípusú beteg vizsgálatainkkor 18 éves volt.

ARPKD betegek: 36, egymással rokon kapcsolatban nem álló beteget vizsgáltunk. Esetükben ultrahangos vizsgálattal igazoltak 2 cm-nél kisebb átmérőjű mikrocisztákat tartalmazó hiperreflektív veséket, a vese hossz legalább 1 oldalon 50 percentilisnél nagyobb volt, a betegség öröklődésmenete autoszomális recesszív öröklődésmenettel kompatibilis volt, húgyúti malformációjuk, más ciliopáthiára utaló extrarenális vagy máj érintettségük nem volt. Egyetlen egy család esetében sem volt ismert rokon házasság.

ARPKD obligát heterozigóták: Hat házaspár genetikai vizsgálatára is sor került. Ezekben az esetekben vagy terhesség termináció, vagy ARPKD okozta perinatális halálozás volt a vizsgálat indikációja, azonban az érintett betegektől mintaanyag nem állt rendelkezésre, így indirekt módon, a szülők vizsgálatával próbáltuk a genetikai diagnózist felállítani.

Marfan szindróma: Vizsgálataink során 26 beteg adatait dolgoztuk fel. A klinikai diagnózis minden esetben Marfan szindróma gyanúja vagy valamilyen ezzel rokon kötőszöveti betegség volt. A klinikai diagnózist klinikai genetikus, gyermekgyógyász vagy belgyógyász állította fel a módosított Ghent nozológia alapján. A betegek átlag életkora 19 év volt (tartomány: 0,1-52 év), 17 beteg esetében alacsonyabb, mint 20 év és két beteg esetében alacsonyabb, mint 1 éves életkor.

Populációs szintű vizsgálatok

Betegek és referencia populáció a Gas6 ELISA tesztelésére: 94 egészséges nem antikoagulált önkéntes kórházi dolgozóból nyertünk plazma mintát (57 nő és 37 férfi). A warfarin hatásának megítélésére a plazma Gas6 szintek meghatározásához 96 mintát warfarin terápiában résztvevő egyéntől nyertünk (46 férfi és 50 nő). Az INR értékei ezeknek a betegeknek 2,0 és 4,5 között voltak.

Időskori macula degeneráció: E tárgyban két epidemiológiai munkát végeztünk kelet-magyarországi populációk vizsgálatával eset-kontroll tanulmány keretei között. Az elsőben 105 AMD beteg és 95 rokon kapcsolatban nem álló etnikailag ugyanolyan csoportba tartozó egészséges kontroll populációt vizsgáltunk. A betegek átlag életkora $74,2 \pm 10$ év, a kontrolloké $78,1 \pm 6,3$ év, ($p=0,001$) volt. A kontrollok 50,5%-a, míg a betegek 54,1%-a volt férfi. Az AMD alapján csoportokba osztva a betegeket 48 korai és 57 késői vagy előrehaladott AMD alcsoport beosztást eredményezett. A korai és a késői alcsoportok esetében a korban nem volt szignifikáns különbség. A kontrollok 37,5%-a míg a betegek 38,4%-a dohányzott. A másodikban 213 exudatív AMD-ben szenvedő beteget, 67 száraz AMD-ben szenvedő beteget és 106 egészséges kontrollt vizsgáltunk meg. Nem volt szignifikáns különbség a száraz és nedves alcsoportokban a betegek korát illetően, a kontrollok szignifikánsan idősebbek voltak mint a betegek, de ez a beválasztási kritériumoknak megfelelően szándékosan történt így. Nem volt statisztikailag kimutatható különbség a betegek és kontrollok között a magas vérnyomás, a mélyvénás thrombosis, a myocardialis infarctus, a dohányzás és a BMI tekintetében sem. A kültéri munkavégzés gyakoribb volt a kontrollokban mint a betegekben.

Infertilitás hátterének vizsgálata: Az Y kromoszóma mikrodeléciók vizsgálata során a betegcsoport 347 infertilis férfi mintáját tartalmazta, akik közül 101 azoospermiás és 246 oligozoospermiás volt. A kontroll csoport 111 normozoospermiás egészséges férfi mintáját tartalmazta. A spermium analízise a WHO ajánlások alapján történt. A miRNS analízisekhez 10 oligozoospermiás egyéntől, 10 asthenozoospermiás egyéntől és 10 egészséges kontrolltól nyert minta anyagot dolgoztunk fel.

DNS szintű módszerek

Célzott mutáció analízis

A leggyakoribb *CFTR* mutációkat az Elucigene CF29 v2 Kittel vizsgáltuk, amelyet a *CFTR*dele2,3(21kb) deléció analízisével egészítettünk ki. Az *ApoE*, *CFH* Y402H, a *LOC387715* rs10490924 illetve a *HTRA1* rs11200638 polimorfizmusok vizsgálatát különböző molekuláris genetikai módszerekkel végeztük. 3 polimorfizmus esetében saját fejlesztésű PCR-RFLP módszert állítottunk be. A *F13A* Val34Leu polimorfizmust, a *Gas6* rs8191974 (c.834+7G>A) polimorfizmust és a *MerTK* rs86016 (g.2920G>A) polimorfizmust hibridizációs próbákkal vizsgáltuk. A komplement C3 rs2230199 (p.Arg102Gly) polimorfizmust PCR-RFLP módszerrel vizsgáltuk. A CFI génben levő rs10033900 polimorfizmust, a *MerTK* I1b rs17835605 (g.4916C>T), *MerTK* I1c rs10496440 (g.8809A>C) és a *MerTK* I4 rs7573344 (g.60127A>G) polimorfizmusokat TaqMan SNP genotipizáló teszttel vizsgáltuk.

Sanger DNS szekvenálás

Sanger szekvenálást alkalmaztunk a *F5*, az *NPC1*, a NDM (*KCNJ11*) analízis és a *HNFA-MODY* (*HNFA1*, *HNFA4* és *GCK*), a *DMD* e4 analízise során, a *DHCR7*, *CFTR*, *PKHD1*, *FBNI* gének vizsgálata során. Minden olyan esetben, ahol a mutáció kimutatása új generációs szekvenálással történt, a detektált mutáció jelenlétét Sanger szekvenálással konfirmáltuk.

CNV vizsgálatok

A deléció/duplikáció analízisre MLPA módszert használtunk (*CFTR*, *DMD*, *ARPKD*). Az Y kromoszóma mikrodeléció analízisre minden régiót két primer párral amplifikáltunk. A deléció jelenlétét az amplifikált termékek hiánya jelezte. A gr/gr, a b2/b3 és a b1/b3 deléció típusokat az sY marker kombinációk jelenlétével illetve hiányával határoztuk meg. A *DAZ* és *CDY1* gének kópiaszámának meghatározására kvantitatív tesztet végeztünk. A kvantitálás a görbe alatti területek összehasonlításával történt a *DAZ* és *DAZL*, illetve a *CDY1* és a *CDY2* között. Az Y kromoszóma haplotípus meghatározás során minden esetben elvégeztük a YAP, 12f2 és 92R7 polimorfizmusok vizsgálatát, míg a részleges AZF delécióval és duplikációval rendelkező egyének esetén további genotipizálást végeztünk.

Új generációs DNS szekvenálás vizsgálatok

Új generációs szekvenálást alkalmaztunk a *DMD*, *FBNI* kódoló régiójának szekvenálására. Gén panel szekvenálást használtunk a hypoglycaemias hyperinsulinismus esetében (*ABCC8*, *GCK*, *HNFI1A*, *HNFI4A*, *HNFI1B*, *INS* és *KCNJ11* gének). Klinikai exom szekvenálást használtunk egy ARPKD esetben. A cél szekvenciák több, mint 95%-a legalább 20-szoros lefedettséggel bírt, a szekvenálási leolvasásokat a hg19 NCBI37 referencia genomhoz illesztettük. A DNS szekvencia variánsokat a NextGene 2.4.2 (SoftGenetics, State College, PA) szoftverrel végeztük. A betegben talált mutációkat a kódoló és splicing régióra szűkítettük, virtuális gén panelként ismert vagy gyanítottan cystás vesebetegségekkel kapcsolatba hozható géneket vizsgáltunk.

Anyai sejt kontamináció szimulációs kísérletek

Az MCC szimulációját genomiális DNS-sel végeztük el úgy, hogy vad típusú (ún. magzati) DNS-t heterozigóta (ún. anyai) DNS-sel kevertük össze. Meghatároztuk a Sanger szekvenálás, az MLPA (egy több exont érintő delécio és egy több exont érintő duplikáció analízisével) és az új generációs DNS szekvenálás (heterozigóta pont mutáció) MCC érzékenységét. Minden mintát duplikátumban vizsgáltunk.

Piroszekvenálás analitikai teljesítőképességének vizsgálata

A plazmid kísérletekben pcDNA3.1 plazmid vektort használtunk. Összesen 12 klónt gyártottunk: 4, 5, 6 tagú homopolimereket állítottunk elő a négy nukleotiddal helyspecifikus mutagenézis segítségével. Minőségi kontrollként a helyspecifikus mutagenézis után Sanger szekvenálással vizsgáltunk két telepet minden mutáció esetében. A plazmid rendszerben minden homopolimert három primerpárral vizsgáltunk annak a hipotézisnek a tesztelésére, hogy a szekvenálás kezdetekor a jel-zaj arány magasabb mint később, ezért ott még lehetővé teszi a pontos HP hossz meghatározását. A HP klónok hossza amplifikált amplikonok hossza 366 és 387 bp között volt. A második kísérleti beállításban a *CFTR* gént vizsgáltuk. 17 klinikai mintát vizsgáltunk ismert *CFTR* mutációs státusz mellett. Összesen 33 homopolimert tartalmazó amplikont vizsgáltunk betegenként. Primereket terveztünk azokra a *CFTR* exonokra is amelyek nem tartalmaznak HP szekvenciákat, hogy képesek legyünk a teljes *CFTR* gén vizsgálatára. A gén legkritikusabb szekcióját (e14) további analízisnek

vetettük alá: 11 olyan humán DNS mintát vizsgáltunk, ahol 4 vad típusú és 7 heterozigóta volt a 2184insA mutációra nézve. A genotipizálási pontosságot úgy határoztuk meg, hogy a pontos szekvencia olvasásokat %-ban adtuk meg az ismert genotípusok esetében. Az elfogadható genotipizálási pontosságot a legalább 75% pontos olvasás esetén fogadtuk el.

Vizsgálatok RNS szinten

mRNS vizsgálatok

Az SLO esetében az össz RNS-t Trizol reagenssel (Invitrogen) izoláltuk, a reverz transzkripció High Capacity cDNA kittel (Life Technologies) történt. A *DHCR7* cDNS-t 4 átfedő fragmens formájában amplifikáltuk Pfu DNS polimerázzal. Egy Marfan szindróma gyanús beteg esetében bőr biopsziás mintavételre került sor. A fibroblast tenyésztést követően (3-5. passzálás) a fibroblastokból totál RNS-t izoláltunk, ezt reverz transzkripcióval írtuk át cDNS-sé. A reverz transzkripció után a 26-os exon és a mellette körbe fogó exon-exon kapcsolati pontok amplifikálásra és Sanger szekvenálásra kerültek. A mutáns/vad típusú allél arányokat a cDNS-ben és a genomiális DNS-ben piroszekvenálással határoztuk meg.

miRNS vizsgálatok infertilitásban

Össz RNS-t izoláltunk mind a spermium sejtekből, mind az ondó folyadékból. A miRNS mennyiségi meghatározásokra egy kis RNS specifikus stem-loop RT-qPCR tesztrendszerrel használtunk. Endogén kontrollként SnoRNA 202-t használtunk, minden kísérletet triplikátumban végeztük. A cél miRNS-ek koncentrációját az SnoRNA 202-re normalizáltuk.

Vizsgálatok fehérjeszinten

FV aktivitás és antigén tesztek, FV immunprecipitáció, SDS-poliakrilamid (SDS-PAGE) gél elektroforézis és immunblotting

A FV koaguláns aktivitás mérése egyfázisú PI alapú teszttel került kivitelezésre. Hasonlóan, a thrombocytalizátumból is ilyen módszerrel mértük a FV aktivitást. A FV antigén szinteket szendvics ELISA módszerrel mértük különböző antitest

kombinációkkal. A vérplazmából immunprecipitáltuk a FV-öt. Az immunprecipitátumokat és a teljes plazma mintát SDS-PAGE analízissel vizsgáltuk, amelyet Western blotting követett különböző antitestekkel. Ezeket a méréseket Dr. Ajzner Éva végezte.

Izom hisztológia, dystrophin immunhisztokémia

Az izombiopsziából 7 mikrométeres vastagságú fagyasztott szekciókat készítettünk, ezeket standard protokollokkal vizsgáltuk. Immunohisztokémiát a dystrophin 1 (centrál core domén), 2 (C-terminális), 3-as (N-terminális) epitóp ellen termeltetett monoklonális antitestekkel végeztünk. Az elsődleges antitest 1:20 hígításban került felvitelre, vizsgáltuk a sarcoglycan alfa, béta, gamma, delta alegységeket, a merosint és a spektrint. Ezek a vizsgálatok Dr. Hortobágyi Tibor irányításával történtek.

Gas6 analitikai módszerek

A HEK293 sejtekben stabilan transzfektált módon termeltetett rhGas6-et immunaffinitás kromatográfiával tisztítottuk szérum mentes médiumból. Az antitesteket teszteltük ELISA-val és immunoblotting módszerrel, annak figyelembevételével, hogy jelölik-e a rhGas6-et. A humán plazma Gas6 izolálása és tisztítása során egy liter citrát foszfát dextróz-antikoagulált friss fagyasztott plazmán bárium citrát precipitációt végeztünk. A visszaoldott precipitátumból a Gas6-et immunaffinitás oszlopon tisztítottuk. Az eluált frakciókat SDS-PAGE elektroforézissel vizsgáltuk. A tisztított rhGas6-et használtuk az aminosav összetétel analízisre a moláris extinkciós koeficiens kalkulálására. A kalkulációban 82 kDa molekulásúlyt használtunk. A kiszámolt moláris extinkciós koeficiens $83676 \text{ L} \times \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ -nek adódott. A tisztított rhGas6 funkcionálisan aktív volt.

A mintákat előkészítés után tömegspektrometriával vizsgáltuk. Bizonyos peptid ionokat, amelyek jelen voltak mind a rhGas6-ben és a gyanított, gélből kivágott Gas6-nek tűnő sávban is, tovább analizáltuk tandem tömegspektrometriával (MS/MS), hogy aminosav szekvencia adatokat nyerjünk belőlük.

A saját fejlesztésű Gas6 ELISA teszt során mindvégig 100 μL teszt térfogatot használtunk. Minden inkubációs lépés - ha máshogy nem írjuk - szobahőmérsékleten történt. Az antitestek optimális koncentrációjának meghatározása sorozat hígítással történt. Az ELISA lemezt AB885 antitesttel fedtük, majd teszt pufferrel blokkoltuk,

ezután a mintákat 10- és 20-szoros higítással adtuk hozzá. A lemezt 4 °C-on egy éjszakán keresztül inkubáltuk és utána a biotinált P05 másodlagos antitestet adtuk hozzá és 5 órán keresztül inkubáltuk. Ez az inkubációs periódus egy ABC szignál amplifikáció lépéssel folytatódott. Az abszorbanciát OPD szubsztrát hozzáadását követően 490 nm-en mértük spektrofotométeren.

A thrombocyta kísérletekhez ACD csőben levett vénás vért használtunk. A mosott thrombocyta szuszpenziót standard módszerekkel alakítottuk ki. A thrombocytaszámot 1000-1400×10⁹/L-re állítottuk be. A thrombocytaoldat felét lizáltuk nyugvó állapotban, a másik felét aktiváltuk 5 U/mL végső koncentrációjú trombinnal. A felülúszót szeparáltuk a maradék csapadéktól, amit szolubilizáltuk TBS 1% Triton X-100 segítségével. A thrombocyta mosási és aktivációs műveletek hatékonyságát immunblottinggal ellenőriztük, ahol különböző Gas6 antitesteket és mint pozitív kontrollt egy poliklonális nyúl anti protein S-t használtunk.

A thrombocyta és plazma immunprecipitációs kísérletekhez 5×10⁸ thrombocytát használtunk (nyugvó vagy aktivált thrombocyta lizátumból vagy felülúszóból) és 120 µL citrát-antikoagulált plazmát. Immunprecipitációt követően a hozzákötődött anyagot eluáltuk SDS minta pufferrel, majd SDS-PAGE szeparálás következett, melyet blottolás követett és utána különböző antitestekkel történő vizualizálás.

A Gas6 c.834+7G>A polimorfizmus esetleges hatását a Gas6 szintre svéd kollaborációban végeztük. 300 anonim egészséges véradó plazmamintájának mérése történt meg a Lundi Egyetemen az általam kifejlesztett ELISA módszer segítségével, míg a genetikai analízist én végeztem.

Egyéb biomarkerek vizsgálata

Az SLO szindróma során klinikai kémiai analíziseket végeztünk. A szérumból 7-DHC szintet határoztunk meg. A szérumból totál koleszterin szint mérése enzimatisz kolorimetriás teszttel történt. Az alpha, beta-lipoproteinek és kilomikron frakciók meghatározása agaróz gél elektroforézissel történt. Az enzim aktivitások meghatározása UV kinetikus módszerrel történt szérumból minta felhasználásával. Ezeket a méréseket Dr. Oláh Anna végezte.

A kis molekulák hatása a koleszterin bioszintézisre közös munkánkban a sejt- és szubsztrát mérési vizsgálatokat kollaborációs partnerünk, a Dr. Mirnics Károly (Vanderbilt Egyetem) vezette kutatócsoport végezte, míg a mi feladatunk a genetikai

tesztelés volt. Az amerikai kutatócsoport olyan sejtkultúra modellt illetve új analitikai folyadék kromatográfiával összekötött tömegspektrometriás módszert fejlesztett ki, amely alkalmas arra, hogy a kis molekulák koleszterin bioszintézis útra kifejtett hatását vizsgálja. Mi magyar Smith-Lemli-Opitz szindrómás betegekből izolált fibroblaszt tenyészeteket bocsátottunk rendelkezésre. Az analitikai protokoll PTAD által történő szterol derivatizáción alapul, rendkívül megbízhatóan képes mérni a 7-DHC szintet, így ezt a módszert a kutatócsoport arra alkalmazta, hogy egy farmakológiailag aktív kis molekula súlyú anyagok hatását a koleszterin szintre mérje. A másik sejtvonal alapú tesztrendszer *Dhcr7*-deficiens Neuro2a sejttípusból állt. Ennek a tanulmánynak továbbvitele során a vizsgálataink célja az volt, hogy *DHCR7* null mutációra nézve heterozigóta egyének, azaz az általunk korábban diagnosztizált betegek szüleinek a fibroblaszt sejtvonalát hasonlítsuk össze normál fibroblasztokkal aripirazole és trazodone expozíciót követően. A sejtvonalak kezelése, a *de novo* lipid bioszintézis vizsgálata és a szterol mérés a Vanderbilt Egyetemen, míg a genetikai tesztelés a mi laboratóriumunkban történt. A fibroblaszt minták biokémiai és genetikailag igazolt SLO szindrómás betegek szüleiből származtak. A heterozigóta szülők genotípusa az alábbi volt: c.[1097G>T];[=], c.[964-1G>C];[=], c.[1295A>G];[=], c.[1328G>A];[=], c.[730G>A];[=], c.[976G>T];[=]. Hat heterozigóta fibroblaszt analízisére került sor hat kontroll minta mellett. A kontrollok között az általunk végzett *DHCR7* gén DNS szekvenálás két ismeretlen jelentőségű variánst igazolt, az egyik egy misszensz mutáció (c.1012G>A heterozigóta formában, ami p.Val338Met cserét jelentett), a másik pedig a c.1341C>T, ami egy potenciálisan splicingot befolyásoló csendes genetikai eltérés. A másik négy kontroll fibroblasztban a DNS szekvenálásunk *DHCR7* genetikai eltérést nem igazolt.

Statisztikai analízisek

A minták eloszlásának vizsgálata Shapiro-Wilk vagy Kolmogorov-Smirnov tesztel történt. A mennyiségi változókat Kruskal-Wallis, Mann-Whitney vagy Student t tesztel hasonlítottuk össze. A korreláció vizsgálatot Pearson korreláció tesztel végeztük (Sperman's rho kalkuláció). A genotípus frekvenciákat chi-négyzet próbával teszteltük. Az eset-kontroll tanulmányokban a relatív kockázatot különböző genotípusok és allélek esetén logisztikus regresszióval határoztuk meg és esélyhányadosként írtuk le. A potenciális zavaró tényezőket vizsgáltuk és amennyiben

statisztikailag kimutathatóan asszociáltak bizonyos genotípusokkal, korrigáltunk rájuk a logisztikus regresszió során. A statisztikai analíziseket GraphPad Prism 7.03 szoftverrel (GraphPad, San Diego, CA) valamint SigmaStat és SPSS szoftverrel végeztük (Systat Software Inc, San Jose, CA, és SPSS Inc, Chicago, DE). $p < 0,05$ alatti értéket fogadtuk el statisztikailag szignifikánsnak.

***In silico* analízisek**

A dystrophin *in silico* vizsgálata során a dystrophin és rokon fehérjéi aktin kötő doménjeinek a kristályszerkezetét a Protein Adatbankból használtuk fel míg, más fehérje információkat az UniProt adatbázisból. A strukturális képeket a PyMOL Molecular Graphics Systemmel készítettük el (Version 1.3 Schrödinger, LLC). A stuktúra alapú szekvencia összehasonlításokat a SALIGN webszerverrel végeztük. A másodlagos struktúra predikcióját a JPred4 szerverrel végeztük. A fehérje stabilitásában bekövetkező változásokat a FoldX algoritmus és az SDM webszerver használatával végeztük el a dystrophin ABD kristályszerkezetének felhasználásával. Az aggregációs tulajdonság predikciója az N-ABD A lánc szerkezete alapján az Aggrescan3D szerver dinamikus predikciós módjának felhasználásával történt. Az *in silico* szerkezeti/predikciós vizsgálatokat Dr. Mótyán János végezte.

A korábban le nem írt mutációk patogenitásának megítélésére különböző predikciós algoritmusokat használtunk: Mutation Taster (<http://www.mutationtaster.org/>), SIFT (<http://sift.jcvi.org>), PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>) és Human Splicing Finder (<http://www.umd.be/HSF3/>) algoritmusokat. A detektált mutációk előfordulását a gnomAD és az 1000 Genom Projekt adatbázisban vizsgáltuk.

EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

FV deficiencia

Az FV aktivitás szint a beteg plazmájában és thrombocyta lizátumában is detektálhatatlanul alacsony volt. Az apa, az anya és az egyik nagymama esetében az enyhén csökkent FV aktivitás szint a heterozigóta állapotnak felelt meg. A DNS szekvenálás két kóroki eltérést definiált, a beteg genotípusa c.[2952delT];[5493insG] volt. Mindkét kóroki mutáció olvasási keret eltolódást és korai terminációt okoz, az egyik a 930., a másik az 1776. aminosav pozícióban. A FV antigén szint a beteg

plazmájában rendkívül csökkent, de detektálható mennyiségben volt mérhető. Az ELISA rendszerek a FV N-terminálisát (nehéz lánc és B-domén) tudták csak kimutatni. A szülők 50% körüli antigén szinttel rendelkeztek. A beteg plazmájában immunprecipitációval százszorosra koncentrált FV antigént egy nagyon halvány 236 kDa körüli sáv formájában lehetett kimutatni, ez megfelelhet a 16-os exonban mutáns fehérjének. Az igen kevés kimutatható antigén elegendő a túléléshez szükséges prokoaguláns aktivitáshoz. Ennek a tanulmánynak a publikáltakon túli tanulsága az, hogy egyik első példája volt a diagnosztikai tudományos tevékenységünk során, hogy a családra jellemző detektált mutációk vizsgálatát prenatális diagnosztikai eljárásban is fel tudtuk kínálni a szülőknek. Ebben az esetben a prenatális diagnosztika chorion biopsziából történt és a magzat esetében az egyik mutáció heterozigóta voltát a másik mutáció esetében a vad allél jelenlétét igazolta, ezáltal a FV hiány kizárható volt, amely tény egyébként születés után megerősítést is nyert.

HNF4A-MODY első hazai esete

A szekvenálás a *HNF4A* génben a c.869G>A, p.Arg290His misszensz mutációt detektált heterozigóta formában. Ez a mutáció a szakirodalomban korábban leírt, ismert patogén eltérés. Eredményeink alapján mindkét beteg esetében az inzulin terápia felfüggesztésre került, diéta tartása mellett sulfonylurea (gliclazid) adása indult meg. A terápia váltást követő egy évben a betegek követése során a klinikum kiváló anyagcsere helyzetet észlelt, a betegek panaszmentesek voltak. Az eset kiválóan példázza azt a nehézséget, amellyel a klinikum szembesül a (monogénes) diabetes diagnosztikája és klasszifikációja során. A két beteg 16 éven, illetve 6 éven keresztül részesült inzulin terápiaiban, mielőtt a MODY genetikai diagnózis felállításra került volna és ezáltal az inzulinterápia elhagyhatóvá vált, nagy mértékű életminőség javulást eredményezve. A két beteg esetében korábban mind 2-es, mind 1-es típusú diabetes diagnózisát felállították, annak ellenére, hogy a családi halmozódás, valamint a diabetes sajátosságai egyértelműen a MODY irányába mutatnak.

De novo ABCC8 mutáció kimutatása hypoglycaemias hyperinsulinismusban

Az *ABCC8* génben egy heterozigóta introni mutációt detektáltunk, a c.4415-13G>A mutációt heterozigóta formában. A szülők genetikai analízise a mutáció *de novo* voltát bizonyította. A c.4415-13G>A mutációt több veleszületett hyperinsulinismusban

szenvedő betegben leírták már. A HH esetében a kezelés célja az agyi károsodás megelőzése. A klinikai menedzsmentben kritikus a gyors genetikai tesztelés. A kezelési algoritmusok a K_{ATP} agonista diazoxid első vonalbeli terápiáját javasolják, a mi betegünk octreotid reszponzív volt, hasonlóan ahhoz az első leírt beteghez.

Terhesség alatti mutáció-specifikus kezelés *KCNJ11* mutáció által okozott diabetesben

Az ismert *KCNJ11* mutációt hordozó család tagja, stabil sulfonylurea kezelés alatt normoglycaemiássá vált, a HbA1c szintje 5,8, 5,2 és 5,2% volt a terhessége alatt. Az újszülött köldökzsinórvér mintájából elvégeztük a genetikai analízist és kimutattuk a mutáció jelenlétét. A kislány nem diabeteses és normálisan fejlődött, mely helyzet még 8 éves korában is fennállt. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a K_{ATP} csatorna gén mutációknak és azok ismeretének fontos szerepe lehet a terhesség menedzsmentjében, hiszen az anyai genotípusnak számottevő a magzatra gyakorolt hatása. Abban az esetben, ha az édesanya neonatális diabetest okozó mutációt hordoz és a magzat erre nézve vad típusú, a sulfonylurea kezelés macrosomiához és neonatális hyperinsulinaemiás hypoglycaemiához vezet, míg abban az esetben, ha az édesanya mutációja mellett a magzat is mutáció hordozó, normális születési súly várható, sőt nagyon sokáig a diabetes nem is jelentkezik. Az eredményeink arra utalnak, hogy a sulfonylureák inzulin alternatívaként szerepelhetnek az érintett várandós nők esetében, abban az esetben, ha a *KCNJ11* K_{ATP} csatorna mutáció által okozott diabetesről van szó, és különösen akkor, ha az érintett beteg visszautasítja az inzulin kezelést.

Új misszensz mutáció detektálása dystrophinopathiában

Az MLPA-val végzett deléció/duplikáció analízis a beteg mintájában a *DMD* gén 4-es exonjának teljes (hemizigóta) hiányát írta le. A 4-es exonra specifikus primerekkel végzett PCR amplifikáció azonban a 4-es exon delécióját nem támasztotta alá. A 4-es exon Sanger szekvenálása egy új hemizigóta pontmutációt írt le (c.227A>T, p.Asn76Ile). Az édesanya célzott genomiális DNS analízise a mutáció *de novo* voltát igazolta. A teljes *DMD* kódoló régió szekvenálása más kóroki mutációt nem igazolt. Az izombiopszia enyhe dystrophias jeleket írt le. A dystrophin expresszió az N-terminális elleni antitesttel az izomrostok zömében negatív volt, a középső régió elleni antitesttel változó intenzitásúnak adódott, míg a C-terminális elleni antitesttel intenzív

lineáris sarcolemmális expressziót, normál mintázatot mutatott. A kristályszerkezet alapján a 76Asn reziduum az N-ABD aktin kötő doménben van, de közvetlenül az aktinhoz nem kötődik. Az Asn76 oldallánc atomok hidrogén kötési távolságban vannak az Asp46 és Glu65 fő lánc atomjaival. Ezek a hidrogén hidak elképzelhető, hogy stabilizáló interakciókat jelentenek a CH1 szubdoménben. A humán dystrophin szekvencia összehasonlítása homológ fehérjékkel az Asn76 reziduum nagyfokú konzerváltságát mutatja. A másodlagos szerkezet predikció alapján a mutáns fehérje fenntartja a teljes másodlagos szerkezetét a vad típushoz hasonló módon. A mutáns dystrophin fehérje a konzervált hidrogén hídját, amely az Asn76 és az Asp46 valamint a Glu65 között van, nagy valószínűséggel elveszíti azáltal, hogy a poláros aszparagin reziduum hidrofób izoleucinná változik. Ez a mutáció a predikció alapján rendkívül destabilizáló ($\Delta\Delta G > 3$ kcal/mol), ami fehérje funkció sérülést jelezhet. A misszensz mutációk ritkák a Duchenne/Becker izomsorvadásban, de nagy részük pontosan az N-ABD domént érinti. Ebben az esetben a fenotípust illető hosszútávú előrejelzést igen nehéz adni, hiszen egy korábban le nem írt mutáció rendkívül korai detektálása bőven a Duchenne/Becker izomsorvadás klasszikus klinikai tüneteinek jelentkezése előtt történt. Az *in silico* analízis igazolja a patogenitást, de nem tud információt adni a betegség súlyosságára nézve.

Kezelést megalapozó genetikai tesztelés - Niemann-Pick C

A klinikai laboratóriumi genetikai diagnosztika összetett heterozigóta misszensz mutációkat mutatott ki az *NPC1* génben: c.3019G>C (p.Pro1007Ala) és c.3182T>C (p.Ile1061Thr) öszetett heterozigóta formában. Mindkét mutáció szakirodalomban szerepel, bizonyítottan patogén eltérés. A szülők vizsgálata igazolta az összetett heterozigóta genotípust. 20,5 éves korában pszichiátriai fekvőbeteg ellátásra volt szükség, ahol az alkalmazott kezelések lényegében hatástalanok voltak. Az agyi MRI közepes diffúz cerebelláris atrophit írt le. A beteg terápiája - közvetlenül a gyógyszer magyarországi engedélyezését követően - miglustat formájában folytatódott, amely a pszichotikus betegség kurzusa alatt kezdődött. 3 hónappal a miglustat terápia kezdete után és 2 héttel az összes többi antipszichotikum terápia befejezése után a pszichotikus tünetek oldódtak és azóta sem tértek vissza. 22 és 23 éves korban az agyi MRI nem mutatott betegség progressziót. Jelenleg 31 éves, és ugyan teljes időben felügyeletet igényel a szülők által, de ambuláns maradhatott. Önellátásra képes, minden nap sportol.

Az MRI azóta sem mutat betegség progressziót. Ennek a tanulmánynak a legfontosabb tanulsága az, hogy egy ritka neurológiai betegség korai felismerése célzott terápiában nyilvánulhat meg. A ritka betegségek, és különösen igaz ez a NPC betegsége, rendkívül nehezen diagnosztizálhatóak. Ebben az esetben a vertikális tekintésbénulás, míg az izolált splenomegalia és a pszichotikus tünetek együttesen irányították a klinikum gyanúját az NPC felé.

Az anyai sejt kontamináció hatása a molekuláris genetikai diagnosztikai tesztekre invazív mintavételt követő prenatális diagnosztika során

A Sanger DNS szekvenálás MCC érzékenységre vonatkozó kísérleteket 6 különböző mutációval végeztük el. A detektálási határértékek 2,5%-os és 15%-os mutáns allél (5-30%-os anyai sejt kontamináció) között voltak. Az MLPA kísérleteket két különböző mutáció típusra, egy több exont érintő delécióra és egy több exont érintő duplikációra határoztuk meg. Deléció esetén a genotipizálás eredményére az anyai sejt kontaminációnak 30%-ig nem volt hatása. 40%-os anyai sejt kontamináció vezetett diagnosztikai bizonytalansághoz. A duplikáció analízis során akár egy 40%-os szimulált anyai sejt kontaminációnak sem volt hatása a genotipizálás eredményére, minden esetben itt normál tartománynak adódott, azaz eddig a határig a teszt a CNV-t normál tartományba mérte. A piroszekvenálás alapú új DNS szekvenálás kísérletek során nagy lefedettségű adat esetén már 0,5%-os mutáns allél is kimutatható volt. Ebben a tartományban 2,5%, 5%, 10%, 15% és 20%-os mutáns allél frakciók esetén a mennyiségi meghatározás rendkívül pontosnak adódott, a várt és a megfigyelt mutáns allél frakció nagyon jól korrelált egymással. A Sanger DNS szekvenálás esetében a mutáció MCC szempontból történő megítélése függ a mutáció típusától, a szekvencia környezettől, az alapvonal variabilitásától, az öröklődés típusától és akár a DNS minőségétől is. Eredményeink alapján az MLPA érzéketlen anyai kontaminációra, ellentétben az új generációs szekvenálással, ami rendkívül pontos kvantitálást tesz lehetővé és igen érzékeny az anyai sejt kontaminációra. Az allél arányok pontos meghatározása így még az anyai sejt kontamináció jelenlétében is mindig lehetővé teszi a diagnosztikai eredmények korrekt interpretációját. Ezeket a vizsgálatokat Dr. Koczok Katalin PhD hallgatóm végezte.

Piroszekvenáláson alapuló új generációs DNS szekvenálás analitikai paramétereinek vizsgálata

A plazmid rendszerben negatív korreláció volt megfigyelhető a homopolimer hossz és a leolvasás pontossága között. Az átlagos pontos lefedettségi ráta a 4 nukleotid esetében 95,8 (tartomány: 79,6-99,3%), 87,4 (tartomány: 36,9-98,4%) és 72,1% (tartomány: 14,5-93,8%) volt a 4, 5 és 6 nukleotid hosszak esetében, ahol a felső értékek arra utalnak, hogy egy gondosan megtervezett a szekvencia kontextust figyelembe vevő optimalizáció során megtalálható a legpontosabb, a teszt rendszerben jól használható változat. A primer lokalizáció nem mutatott összefüggést a genotipizálás pontosságával. Hat ismert genotípusú CF betegben vizsgáltuk a *CFTR* kódoló régiót és az exon-intron határokat. Habár az egyedi pontosság nagy tartományban szórt (52,2-99,1%) az átlagos pontosság nagyon jónak adódott (89,3%). A tesztrendszer képes volt kimutatni a kis skálájú mutációk közül a misszensz, nonszensz, splice helyeket érintő mutációkat, az olvasási keret eltolódást, és olvasási keret eltolódást nem okozó deléciókat és inzerciókat, amelyeket korábban Sanger szekvenálással mutattunk ki, 100%-os szenzitivitással és specificitással. A 24 homopolimer vizsgálata során a saját tervezésű primerek jó teljesítményt mutattak, több mint 80%-os genotipizálási pontossággal egy kivétellel minden homopolimer esetén. Ez a kivétel a 7A homopolimer mintázat (e14, c.2046_2052) volt, ahol nem volt elérhető az elvárt genotipizálási pontosság. A piroszekvenálás komoly limitációja a homopolimerek pontatlan analízise. Azt találtuk, hogy a piroszekvenálás elfogadhatóbb a rövidebb homopolimerek esetében és ahogy nő a hossz, egyre pontatlanabbá válik. A vizsgálataink második részében *CFTR* klinikai laboratóriumi genetikai diagnosztikai tesztfejlesztést végeztünk és annak analitikai teljesítőképességét vizsgáltuk klinikai mintákon. A teszt kifejezetten jó szenzitivitást és specificitást mutatott, az összes variánst (misszensz, nonszensz, splice hely mutációk, kis deléciók, inzerciók), amelyet korábban Sanger szekvenálással kimutattunk, képes volt konfirmálni mind a homopolimert tartalmazó, mind a homopolimert nem tartalmazó régiók esetében. Ennek kivétele volt a 2184insA mutáció környezete, ahol nem sikerült elérni az elvárt pontosságot semmilyen optimalizációs módszerrel. Ebben az esetben a piroszekvenálás mellett még mindig kénytelenek vagyunk Sanger szekvenálással vizsgálni ezt a régiót.

***CFTR* mutációk magyarországi CF betegekben**

Az első kohorsz vizsgálata során az Elucigene CF29 v2 teszttel a p.Phe508del mutációt 56/80 CF allélen sikerült kimutatnunk (70%). Gyakori mutációk voltak a p.Asn1303Lys (4x; 5%), p.Gly542X (3x; 3,75%), 1717-1G>A és p.Arg347Pro (1x mindkettő; 1,25%). A *CFTR*dele2,3(21kb) mutáció 4 CF allélen volt jelen (5%). Egy mutáns allélt sikerült kimutatnunk 11 minta esetén így ezeket tovább vizsgáltuk DNS szekvenálással. 4 betegben a p.Gln685ThrfsX4 (2184insA, 5%) mutációt tudtuk kimutatni. Egyetlen egy betegben a második *CFTR* mutáció definiálása nem volt sikeres. Ebben a vizsgálatunkban egy évtizedes elmaradást kívántunk pótolni, hiszen a korábbi vizsgálatok, amelyek a magyar mutáció spektrumot fedték le az a legfrissebb is 1996-ra datálható. Vizsgálati kohorszunk Magyarországnak egy kb. 2 milliós lakosságszámú régiójából származott. A mutációk heterogenitása az észak-déli európai grádiensbe beleilleszthetők. Rendkívül érdekes és korábban nem ismert tény volt az, hogy a szláv eredetű *CFTR*dele2,3(21kb) 5%-ban fordult elő, mely a harmadik leggyakoribb Csehország (6,4%) és Oroszország (5,7%) mögött. A magyarázat erre az lehet, hogy a honfoglalás idején a Kárpát-medencét szláv törzsek népesítették be és ezek a szláv törzsek asszimilálódtak az ő területeiket elfoglaló magyar törzsekbe. Szintén érdekes a 2184insA magas frekvencia (5%), amely szintén szláv eredetű, Nyugat-Ukrajnában ez a második leggyakoribb mutáció. A vizsgálatainkra kaszkád megközelítést alkalmaztunk, mely során először a gyakoribb mutációkat vizsgáljuk, majd pedig szekvenálást és a nagy átrendeződések vizsgálatát. A CF29v2 teszttel a mutációk 81,25%-át tudtuk kimutatni, míg a szláv delécio vizsgálata a detektálási szenzitivitást 86,25%-ra emeli. A *CFTR* gén szekvenálás pedig ahhoz szükséges, hogy kimutassuk a további mutációkat. Összességében a CF-t okozó patogén mutációk 98,75%-át sikerült kimutatni. A kiterjesztett betegcsoport *CFTR* mutáció analízise során 27 különböző mutációt találtunk, az p.Phe508del 53,3%-ban volt jelen. Négy mutációt (W1282X, N1303K, *CFTR*dele2,3(21kb) és 2184insA) mutattunk ki 4,4%-ban, míg másik 4 mutációt (G542X, Y1092X, 621+1G>T, és 2143delT) mutattunk ki több, mint egy allélen. Az MLPA analízis a 2-es exont érintő deléciót mutatott ki egy betegben heterozigóta formában. Munkánk során sikeresen bővítettük ki a magyar CF adatbázist. 31 különböző mutációt találtunk a két vizsgálatban, kettő ezek közül új volt. Ezek az új mutációk minden valószínűség szerint patogén eltérések, az egyik olvasási keret eltolódást okoz és egy korai terminációt (c.1037_1038insA, p.Leu346Hisfs*17),

a másik misszensz (c.1394C>T, p.Thr465Ile). Konklúzióként levonhatjuk, hogy a vizsgálatok azon túl, hogy megállapítja a mutációk előfordulását a magyar CF betegekben, nagyon jó alapul szolgálhatnak az újszülöttkori szűrésben, amennyiben olyan teszt kombinációt lehet elérni, hogy a 85-90% elvárt szenzitivitást az újszülöttkori szűrő teszt DNS oldala tudja biztosítani. Vizsgálataink megkezdésekor nem álltak még rendelkezésre mutáció specifikus terápiák, de az elmúlt időszakban a molekuláris epidemiológiai felméréseink megnyitották a lehetőséget egy sokkal kiterjesztettebb, teljes áttekintést adó olyan vizsgálat sorozatra, amely jelenleg is folyik és amelynek feladata a teljes magyar CF regiszter több, mint 500 fős betegcsoportjának genetikai revíziója. Meggyőződésem, hogy ez a genetikai revízió hozzásegítheti a magyarországi CF betegeket is ahhoz, hogy megkaphassák a legmodernebb mutáció specifikus kezeléseket abban az esetben, ha azok Magyarországon engedélyeztetésre kerülnek. Azt gondolom, hogy a korábbi molekuláris epidemiológiai felméréseink nélkül ez az összefoglaló, standardizált módszerekkel történő genetikai analízis nem jöhetett volna létre, ami felhívja a figyelmet arra, hogy a súlyos monogénis betegségek molekuláris epidemiológiai felmérése, a mutáció spektrum meghatározása, direkt transzlációval rendkívül gyorsan terápiás kezelési információkra fordítható le. A *CFTR* genetikai vizsgálatokat Dr. Ivády Gergely PhD hallgatóm végezte.

SLO kutatómunka

Az SLO kohorsz vizsgálata során minden beteg esetében extrém emelkedett szérum 7-DHC szintet tudtunk mérni. A koleszterin szintek általában alacsonyak voltak. A 13-ból 12 beteg esetében sikeresen állítottuk fel a molekuláris genetikai diagnózist. Az ismert nonszensz, misszensz és splicing defektust okozó mutációk mellett egy korábban nem leírt, patogénnek minősített misszensz mutációt, a c.374A>G (p.Tyr125Cys) mutációt mutattuk ki heterozigóta formában. Egy esetben egy három szintű genetikai analízist végeztünk el. Az első szintű a kódoló régió vizsgálata egy korábban leírt patogén mutációt mutatott ki (c.452G>A (p.Trp151*)). A második szintű genetikai tesztelésben a nem kódoló exonokat és a szabályzó régiókat vizsgáltuk meg, ez eredménytelen volt, a harmadik szinten pedig cDNS szekvenálást végeztünk a beteg mintájában, amely alapján nem volt kimutatható más mutáció, ami érintené a kódoló régiót, ami arra utal, hogy inkább az mRNS mennyisége, mint minősége érintett a másik, nem identifikált genetikai eltérés által. Vizsgálataink bebizonyították a

nonszensz mediálta mRNS lebomlás jelenlétét, hiszen a fehérvérsejtekből nyert mRNS-ben nem volt kimutatható p.Trp151* allél.

A földrajzi különbségek jelen vannak az SLO mutáció spektrumában is. Az irodalomban leírt leggyakoribb c.964-1G>C mutáció, amely valószínűleg brit eredetű és gyakran kimutatható a Mediterráneumban, viszont szinte teljesen hiányzik a szláv eredetű népességből a mi beteganyagunkban a második leggyakoribb volt, négy allélen volt jelen. A leggyakoribb mutáció a p.Trp151* volt (6 eset). Egy család kivételével a patogén mutáció kombinációk nonszensz-misszensz, misszensz-misszensz vagy splicing-misszensz mutációk, ami azt jelenti, hogy egyfajta reziduális enzim aktivitás ezekben az esetekben nem zárható ki. Egy nonszensz mutáció bizonyosan, míg egy splicing mutáció nagyon valószínűen teljes funkcióvesztést jelent, de egy misszensz mutáció esetében valamilyen fokú aktivitás megtartott maradhat. Az egyedüli eset, ahol kettő igazolt null allélt mutattunk ki (c.964-1G>C) az első érintett gyermek, az első életnapon halt meg és a második és harmadik terhessége az édesanyának spontán vetéléssel végződött a 7. és 14. héten. Összességében ezek az eredmények arra utalnak, hogy a korábbi megfigyelések valószínűleg helytállóak, miszerint két súlyos null allélt eredményező mutáció nagyon ritka kivételtől eltekintve nem kompatibilis az élettel. Eddigi munkánk során öt család esetében kilenc alkalommal végeztünk prenatális genetikai diagnosztikát (hét esetben chorion biopszia, két esetben magzatvíz mintavétel). Két esetben detektáltunk kóros genotípust, míg a megszületett hét gyermek közül mind a vizsgált öt esetben egyezett a pre- és posztnatális molekuláris diagnosztika eredménye. A prenatális molekuláris diagnosztika esetén a minta laboratóriumba érkezése és az eredmény közti leletátfordulási idő átlagosan 2,55 nap (legrövidebb 1, leghosszabb 4 nap) volt.

Biomarker vizsgálataink során azt találtuk, hogy kezdeti koleszterin/7-DHC ráta a klinikai súlyossági fokkal egy hasonló gyenge inverz kapcsolatot mutatott ($r=0,669$). A három SLO súlyossági csoport statisztikai analízise szignifikáns különbségeket mutatott a kezdeti koleszterin szintekben és az enyhe és súlyos csoportok között ($p=0,01$). A koleszterin /7-DHC ráták a csoportok közt szintén különbséget mutattak ($p=0,004$).

A kollaborációs partnerünk által végzett kísérletekben 727 kis molekula súlyú anyagból 30 anyag csökkentette a 7-DHC szintet az egyik alapvető sejtvonal alapú tesztrendszerben, a *Dhcr7*-deficiens Neuro2a sejtekben. Ezek a kísérletek azt mutatták,

hogy sztatinok, ösztrogén receptor modulátorok és bizonyos antifungális szerek a 7-DHC szintet csökkentik. A normál kontroll Neuro2a sejteken tesztelve a kutatócsoport kimutatta, hogy az aripiprazole és a trazodone a 7-DHC szint emelkedését eredményezi ezen a sejtvonalon. A 7-DHC csökkentő terápia felé vezető úton a 7-DHC szint csökkentő kis molekulású anyagok felmérése jelentős lépés lehet. Az aripiprazole és a trazodone, melyek nagyon gyakran használt antipszichotikumok 7-DHC szint emelő hatásának megfigyelése egy újabb kutatási irányt indított.

A különböző koncentrációval tesztelt aripiprazole és trazodone expozíció 6 napos tenyésztést követően szignifikánsan megemelkedett 7-DHC szintet mutatott ki mind a heterozigóta, mind a kontroll fibroblasztokban, a heterozigóta fibroblasztokban ez a 7-DHC szint átlagban kétszerese volt a kontrollokhoz képest. Az össz koleszterin szintet a kezelés mindkét esetben enyhe mértékben csökkentette. Az aripiprazole és trazodone kezelés a koleszterin bioszintézis útját érinti. A heterozigóták esetében szignifikánsan kevesebb koleszterin keletkezett a vad típusúakhoz képest mind aripiprazole, mind trazodone kezelés esetén, míg a 7-DHC magas szintje volt kimutatható, különösen a heterozigótákban. A két VUS (kontrollnak induló) fibroblaszt esetében érdekes eredményeket kaptunk. A c.1341C>T genotípusú sejtvonal, amely esetében egy potenciálisan splicingot érintő mutációt mutattunk ki, a heterozigótákhoz hasonló módon reagált az aripiprazole kezelésre, de a trazodone-ra inkább kontrollként. A c.1012G>A mutációt hordozó sejtvonal mindkét kezelésre normál kontrollnak megfelelően válaszolt, ami azt mutatja, hogy kevésbé valószínű, hogy a hatása patogén lenne, míg a c.1341C>T mutáció némiképp átmeneti lehet. Összességében megállapítható, hogy az aripiprazole és trazodone kezelés dóziszfüggően szignifikánsan megemeli a 7-DHC szintet a heterozigóta fibroblasztokban, a *DHCR7* vad típusú és heterozigóta fibroblasztok a humán terápiás tartományú aripiprazole és trazodone kezelésre különféleképpen reagálnak. A heterozigóta genotípusú fibroblasztoknak a 7-DHC szintekre nézve sokkal határozottabb válasza van, mint a kontroll fibroblasztoknak. Az izotópos mérések bizonyították azt, hogy a kezelések során a koleszterin bioszintézise érintett, nem pedig a stabilitása vagy a körforgása. Mivel a koleszterin prekursor profil nem változott a kezelés során, az elsődleges aripiprazole és a trazodone hatás a 7-DHC-koleszterin átalakulásban érhető tetten. Ugyan az eredményeink heterozigóta fibroblasztokon történő kísérletekből jöttek létre, de könnyen lefordíthatók a betegségben érintett egyik kritikus szervrendszer, a központi

idegrendszer nyelvére is, hiszen a neuronok jelentős koleszterin szintetizátorok, a *DHCR7*-nek rendkívül erős expressziója van az agyban. A 7-DHC emelkedés káros, hiszen rendkívül reaktív lipid molekula. A mi megközelítésünk a személyre szabott medicina irányába tett erőfeszítésként értelmezhető. Ezekkel a vizsgálatokkal keretbe foglalva az SLO tanulmányokat látható az, hogy egy súlyos monogénes betegség molekuláris epidemiológiai felmérése milyen új kutatási irányokat nyithat meg.

A genetikai tesztelés beállítása (2008) óta végzett prenatális diagnosztika az, amit ebben az esetben felkínálhatunk a szülőknek és célzott diagnosztikával az egészséges gyermekek születése biztosítható. Ezen túlmenően, a sokkal nagyobb populációt érintő kitekintések is, akár a patomechanizmus jobb megértése, akár a szinte népegészségügyi jelentőségű következtetések levonásában rejlő lehetőségeket is jelentheti. Az SLO munkánk jelentős része kollaboráció keretében zajlott. Ez magában foglalta a klinikai (Dr. P. Szabó Gabriella), a laboratóriumi diagnosztikai (Dr. V. Oláh Anna) és az alapkutatói (Dr. Zeljka Korade, Dr. Mirnics Károly, Dr. Ned Porter, Vanderbilt Egyetem) együttműködéseket egyaránt.

Monogénes kohorsz vizsgálatok: Fenokópiák ARPKD-ben

A 36 ARPKD klinikai diagnózissal rendelkező beteg esetében 27 esetben (75%) találtunk két *PKHD1* kóroki mutációt, ezek közül 25 beteg biallélikus pont mutációkat tartalmazott, kettő pedig összetett heterozigótának bizonyult egy pont mutációra és egy CNV-re (dup33-35 és dele1-55). Egy beteg egy heterozigóta olvasási keret eltolódást eredményező mutációval rendelkezett. Egyetlen egy *PKHD1* mutációt sem sikerült találni nyolc családban. Két mutációt, a p.Thr36Met és a p.Ser2639* találtunk gyakoribbnak a többinél, 15/54 (28%) és 8/54 (15%) aránnyal rendelkeztek a mutáns allélek között. 7 új, korábban le nem írt mutációt sikerült kimutatnunk, a fentebb bemutatott két CNV mellett 3 trunkáló mutációt (c.5_8delCTGC, p.Ala3Glyfs*2; c.5088delTG, p.Gly1696fs*1; c.12036delA, p.Gly4013Alafs*24) és két aminosav cserével járó eltérést (c.4328G>A, p.Cys1443Tyr és c.10621A>T, p.Asn3541Tyr). Indirekt ARPKD diagnosztikát végeztünk obligát heterozigótákban (nem publikált adat). A *PKHD1* analízis a hat érintett pár minden tagjában igazolta a patogén *PKHD1* eltérést, utat nyitva a következő terhesség esetén a prenatális diagnosztika felé.

Mind a nyolc család esetében, ahol *PKHD1* mutációt nem sikerült kimutatnunk, más génekben bekövetkező kóroki mutációkat sikerült detektálnunk. Három esetben *de*

novo HNF1B deléciót, két esetben *de novo PKD1* mutációkat sikerült detektálni. Egy beteg *de novo TSC2/PKD1* deléciót hordozott. Egy beteg összetett heterozigótának bizonyult egy teljes és egy részleges *NPHP1* delécióra nézve. Egy testvérpár a leggyakoribb *TMEM67* p.Cys615Arg mutációra nézve volt homozigóta (a számításokban csak az egyik testvér adatait vettük figyelembe). Egy beteg esetében, aki heterozigóta *PKHD1* mutációra nézve, más génben bekövetkező patogén mutációt nem tudtunk kimutatni az igen alapos genetikai tesztelés ellenére sem (klinikai exom szekvenálás). A kohorsz betegei esetében megállapítottuk a fenotípusos jellemzőket is. A *PKHD1* mutációt hordozó 27 betegből 19 gyermeknél (70%) perinatális légzési elégtelenség volt kimutatható. Kilenc beteg (33%) 3 hónapos életkor előtt elhunyt. Ezzel ellentétben a más génekben bekövetkező mutációt hordozó 8 családból 9 betegből összesen egy beteg mutatott átmeneti perinatális légzési elégtelenséget, amely egyébként infekció következtében alakult ki. A perinatális periódust túlélő *PKHD1* mutációval rendelkező 10 gyermekből 9 esetben egy éves korra hipertensio fejlődött ki, míg a más génekben bekövetkező mutációt hordozó betegek esetében egy sem mutatott hipertenziót. A diagnóziskori +4 SD-nél nagyobb átlagos vese hossz a *PKHD1* ARPKD-re volt specifikus. Ezen adatoknak alapján a beteg, akinél nem sikerült tisztázni a genetikai háttért, valószínűsíthetően a *PKHD1* által okozott közepesen súlyos ARPKD-ben szenved (korai hipertensio, nagy mértékben megnagyobbodott vese és máj fibrózis volt jelen).

Ebben a vizsgálat sorozatban, az ARPKD genetikai hátterét derítettük fel a magyarországi ARPKD betegekben. A *PKHD1* pozitív esetek aránya 78% volt, ami jól korrelál a nemzetközi adatokkal. Biallélikus CNV-t nem sikerült kimutatnunk, mely eredményünk is jól korrelál más betegcsoportok vizsgálatával. Detektáltunk egy 3 exonos duplikációt és egy nagy méretű deléciót. A duplikációk a *PKHD1* génben rendkívül ritkák, mi publikáltuk a második ilyen esetet. Ezek az eredmények azt hangsúlyozzák, hogy a CNV-k analízise a heterozigóta *PKHD1* pontmutációval rendelkező ARPKD betegek esetében elkerülhetetlen. Minden olyan betegben, akiben nem volt *PKHD1* mutáció, a fenotípus re-evaluációját követő genetikai vizsgálat kimutatta a kóroki tényező(ke)t, azaz a kiindulási klinikai ARPKD diagnózis 22%-a fals diagnózisnak adódott. Az utolsó beteg fenotípusa alapján a *PKHD1* biallélikus mutációja valószínűsíthető. Ez felhívja a figyelmet arra, hogy még a jelenleg elérhető legmélyebb genetikai analízis sem képes 100%-os diagnosztikai szenzitivitás elérésére

bizonyos lokalizációjú mutációk esetén. A *PKHD1*-től független génekben történő eredményes genetikai analízisünk a betegek fenotípusos szempontból történő re-evaluációjának jelentőségére világít rá. A differenciál diagnózis a diagnózis idején nagyon nehéz lehet az enyhe és közép súlyos formák esetében. A betegcsoportunkban a csecsemő korban bekövetkező hypertensio nagyon jól korrelált a *PKHD1* mutációk jelenlétével. A szakirodalommal egybehangzóan a *PKHD1* mutációt hordozó betegek fenotípusa erősen korrelál a kóroki mutáció típusával, olyan beteget nem találtunk, aki túl élte volna a perinatális periódust, a bizonyosan funkció vesztes biallélikus mutációk jelenléte esetén.

Összefoglalásképpen, elsőként vizsgáltunk Magyarországon egy nagy ARPKD kohorszt. Az ARPKD esetek negyedében fenokópiákat igazoltunk, amelyek más génekben bekövetkező mutációk miatt alakultak ki. Az adataink azt támasztják alá, hogy a perinatális légzési elégtelenség, a +4 SD-nél nagyobb vese hossz és a korai jelentkezésű hypertensio a *PKHD1* által okozott ARPKD-re utal. Azokban az esetekben, ahol *PKHD1* mutáció analízis negatív, fontos, hogy a fenotípus re-evaluációra kerüljön és javasoljuk a *PKHD1* kópiaszám analízist is azokban a betegekben, akik heterozigóta kis skálájú mutációval rendelkeznek, és azokban a családokban, ahol nem kérdéses a fenotípus. Az obligát heterozigóta szülők eredményes genetikai analízise lehetőséget nyújt a következő terhességben a prenatális diagnosztika elvégzésére. Ez az indirekt diagnosztika rendelkezésre áll az olyan egyértelmű ARPKD esetekben, ahol az érintett betegtől minta már nem hozzáférhető. Ez a munka nagy hazai kollaborációban valósult meg, a legfontosabb partnerek Dr. Szabó Tamás (Debreceni Egyetem) és Dr. Tóty Kálmán (Semmelweis Egyetem) voltak.

Monogén kohorsz vizsgálatok: Marfan szindróma

A kohorszba a betegek bizonyosan Marfan szindróma, Marfan szindróma gyanú vagy ezzel rokon fibrillinopathia klinikai diagnózisával kerültek be. Genomiális DNS, illetve egy esetben RNS mintát vizsgáltunk 26 betegben. Összesen 23 kóroki vagy lehetségesen kóroki tényezőt definiáltunk 23 betegben. A 23 betegből 7-ben (30,4%) új, korábban le nem írt mutációt, míg 16 esetben (69,6%) korábban leírt variánst találtunk. 23 beteg esetében állt rendelkezésünkre családfa adat. Hét betegben 7/23 (30%) a betegség sporadikus előfordulása volt, míg 16 esetben familiáris forma.

Misszensz mutációt definiáltunk 69,6%-ban (16/23), kis delécio/duplikációt 13%-ban (3/23) és splicing mutációt 17,4%-ban (4/23). Egy visszatérő csendes mutációt definiáltunk három nem rokon kapcsolatban álló betegben, amely mutációt az mRNS analízist követően benignusnak minősítettünk. A 16 misszensz mutációt hordozó betegből 11 esetben a konzervált cisztein reziduumokat érintő mutáció volt. Közülük három korábban le nem írt volt. Az esetek kb. 1/3-ban (5/16, 31,2%) olyan misszensz mutációkat találtunk, amelyek nem cisztein aminosavakat érintenek. Egy mutáció (c.3038G>T, p.Gly1013Val) korábban le nem írt, új volt. A kimutatott misszensz mutációk besorolása a módosított Ghent nozológia és az ACMG ajánlása alapján történt. Három betegben találtunk kis duplikáció/delécio. Mindegyikük olvasási keret eltolódást és nagy valószínűséggel trunkált fehérjét vagy NMD által lebontott mRNS-t eredményez, így mind a hármat patogénnek minősítjük. Két variáns új volt, míg egy korábban publikált egy Marfan szindrómás betegben. Négy splice mutációt detektáltunk (4/23, 17,4%). Két mutáció, a c.1468+5G>A és a c.4337-2A>G korábban leírt. Egy korábban az irodalomban már leírt csendes variáns, a c.3294C>T (p.Asp1098=) három betegben került kimutatásra, mindhárom beteg enyhe fenotípussal bírt. A variáns jelen van a HGMD-ben és a Universal Mutation Database-ben. A mutáció és a fenotípus kapcsolatáról kevés adat áll rendelkezésre. A patogenitásnak nincs egyértelmű bizonyítéka, de nem volt kizárható a splicing defektus a predikciók alapján. A minor allél frekvenciája alacsonyabb, mint 0,01% a GnomAD-ban és az 1000 Genom Projektben. A Human Splicing Finder potenciálisan splicingot érintő mutációnak definiálja. Ezt a mutációt részletesebben mRNS szinten is megvizsgáltuk. A fibroblasztokból izolált mRNS-t Sanger szekvenálással vizsgáltuk, a 26-os exont és az exon-exon kapcsolódási pontokat, és kimutattuk, hogy ez a mutáció kb. 50%-ban van jelen a beteg cDNS szekvenciájában. A pontos allél arányokat piroszekvenálási módszerrel végpontos mennyiségi meghatározással határoztuk meg. A gDNS-ben 750-szeres lefedettség mellett az allélek aránya 57,47%:42,53% (C:T) volt, míg a cDNS mintában 611-szeres lefedettség mellett 43,86%:56,14% (C:T). Nem volt kimutatható sem NMD sem pedig exon 26 skipping. Ezek alapján a variánst mi jóindulatú benignus variánsnak minősítjük, a következők miatt: (A) az allél frekvenciája ennek a variánsnak magasabb, mint amit elvárnánk egy betegséget okozó variánstól, (B) aberráns splicingot detektálni nem tudtunk, habár elvégeztük az ez irányú analíziseket.

Ebben a vizsgálatsorozatban mi 23 *FBNI* variánst detektáltunk Marfan szindrómában vagy vele rokonítható kötőszöveti betegségben. A módosított Ghent nozológia rendkívül jó specificitást mutat a Marfan szindrómás betegek identifikálásában, meghatározza a kóroki *FBNI* mutációkra szolgáló kritérium rendszereket és ez nagy mértékben segíti a 25-30%-ban talált új mutációk klasszifikálását. A Marfan szindróma klinikai diagnózisa nem egyszerű az átfedő fenotípusú betegségek esetében, a korfüggő klinikai tünetmegjelenés miatt, illetve az erőteljes intra- és interfamiliáris expresszivitásbeli különbség okán. Összesen 23 kóroki vagy valószínűsíthetően kóroki *FBNI* variánst találtunk amelyeknek egyharmada új mutáció volt. A mutációk 2/3-a misszensz mutáció volt, a nagy részük a cbEGF motívumokban foglalt helyet és kb. 70%-uk a konzervált cisztein aminosavakat érintette, jó összhangban az irodalommal. Öt olyan misszensz mutációt találtunk, ahol nem volt cisztein aminosav érintett. Az *FBNI* mutációkat a teljes kódoló régióban ki tudtuk mutatni, összesen egy forró pont definiálható. A legsúlyosabb és gyors progressziót mutató forma esetén a 24-32 exon között halmozódnak fel a mutációk. Nekünk két 1 éves kor előtt tesztelt betegünk volt. Egy misszensz (c.3038G>T, p.Gly1013Val, a 24-es exonban), és egy splicing (c.3082+1G>A, a 24-es intronban) mutációról van szó. Az utóbbi beteg esetében a szülők nem voltak érintettek, így valószínűsíthetően *de novo* mutációs történés volt, míg az előbbi beteg esetében az édesapa a genetikai tesztelésbe nem egyezett bele, de fenotípusosan marfanoid jegyeket mutatott. A p.Gly1013Arg egy meglehetősen gyakori visszatérő mutáció, súlyos cardiovascularis, skeletális manifesztációkkal és ectopia lentissel jár együtt. A c.3082+1G>A splicing mutáció esetében a 24-es intron donor splicing helye érintett, így úgy gondoljuk, hogy a mutáció a 24-es exon skippingjéhez vezethet. Mindkét betegünk a spektrum súlyosabb felén helyezkedik el, összhangban az irodalommal. Exonban levő csendes mutáció okozhat exon skippinget. Megvizsgáltuk a c.3294C>T mutáció hatását a mRNS splicingra. Ezt a mutációt korábban olyan kötőszöveti betegségben szenvedő betegekben írták le, akik nem egyértelműen minősíthetők Marfan szindrómásnak. A mutáció esetében exon skipping nem volt igazolható. Az allél ráta vad típusú és mutáns allél esetében azonos volt, nagyon közel volt az 1:1 arányhoz mind a genomiális, mind a cDNS-ben. Meglepő, hogy ez a mutáció 3 egymással rokoni kapcsolatban nem álló betegben volt kimutatható és az irodalomban is hasonló klinikai tünetekkel rendelkező betegekben, ectopia lentis

és aortagyök tágulat nélkül. Amennyiben ez a mutáció mégis patogén, egy eddig ismeretlen mechanizmus vezethet a tünetek kialakulásához.

Ebben a munkában 26 egymással rokoni kapcsolatban nem álló egyén esetén, 7 új és 16 visszatérő mutációt definiáltunk 23 betegben. A mutációk zöme Marfan szindrómával volt rokonítható, két esetben korai jelentkezésű és nagyon súlyos formájával a betegségnek. Egy csendes mutáció esetében a patogenitást igazolni nem tudtuk. A munkánk jelentőségét az alábbiakban látom: (A) ez volt az első hazai nagy Marfan genetikai kohorsz, (B) genetikai diagnosztikai protokollt dolgoztunk ki, melyet folyamatosan alakítottunk a módszertan fejlődésének megfelelően, (C) megállapítottuk, hogy egy kivételtől eltekintve a magyar betegekben mutációs forrás nincs, így mindenkor a teljes gén vizsgálat indokolt, (D) a Marfan szindróma rutin genetikai tesztelése megnyitja az utat a pontos klinikai genetikai tanácsadás felé, (E) a preszimptomatikus (kaszád) tesztelés életmentő megfigyelési/beavatkozási lehetőséget jelent, (F) a Marfan szindróma részét képezi az exom/genom szekvenálás során kötelezően vizsgálandó véletlen találati listának (ún. ACMG panel), így eredményeink hozzájárulnak a megfelelő interpretációs protokoll kialakításához az egyre inkább teret nyerő exom/genom szekvenálási alapú klinikai laboratóriumi genetikai diagnosztika esetében. Az *FBN1* genetikai vizsgálatokat Madar László PhD hallgatóm végezte.

Gas6 vizsgálatok

A humán thrombocyta Gas6 tartalmának vizsgálatára izolált thrombocyta-t vizsgáltunk Western blottinggal két monoklonális és 4 poliklonális Gas6 elleni antitest segítségével. Kontrollként a thrombocyta-kban igazoltan jelen levő protein S-t használtuk. A Gas6 nem volt kimutatható a thrombocyta lizátumban és az aktivált thrombocyta felülszójában. Ezzel ellentétben, a protein S egyértelműen detektálható volt a nyugvó thrombocyta-kban, az aktivált thrombocyta-k felülszójában, de nem volt kimutatható a trombin aktivált thrombocyta lizátumban, amely arra utal, hogy a trombin aktiváció során a protein S kikerül a granulumokból. Hogy tovább vizsgáljuk a Gas6 esetleges jelenlétét a thrombocyta-kban vagy a plazmában, immunprecipitációt végeztünk 5×10^8 thrombocyta-val, amely ekvivalens 1-2 mL teljes vér thrombocyta tartalmával. Ezt a mintát, valamint 120 μ L plazmát SDS-PAGE-en futtatva és blottolva, a Western blotting membránt biotinált poliklonális anti-Gas6 antiszérummal

inkubáltuk. Gas6-et nem tudtunk kimutatni a thrombocyta extraktumból, viszont egy nagyon halvány sávot tudtunk detektálni a Gas6 plazma immunprecipitációs mintából, amely olyan molekulasúlyban vándorolt, ahol a rhGas6. Ezt a Gas6 immunprecipitációt két másik antitest kombinációval is megismételtük. Gas6 nem volt kimutatható a thrombocytákban, egyik immunprecipitáció-immunblotting kombinációval sem. Hogy tovább vizsgáljuk a Gas6 potenciális - meglepő - jelenlétét a plazmában, egy tisztítási protokolt használtunk a plazma Gas6-re. Bárium citrát adszorpciót követően a precipitátumban egyértelműen tudtuk detektálni a Gas6-et, de a mosó frakcióban nem. Monoklonális antitestet használtuk affinitás kromatográfiára. Az eluált proteineket SDS-PAGE-en futtattuk meg, és azt a sávot amely a rekombináns Gas6-nek megfelelő molekulasúlyban vándorolt, gélen belüli tripszin emésztésnek vetettük alá, és utána tömegspektrometriával vizsgáltuk. Az elsődleges tömegspektrum számos humán Gas6 frakció tömegét állapította meg, összességében az identifikált peptidek az érett Gas6 szekvencia 28%-át lefedték. Az elsődleges tömegspektrum adat megerősítésére 8 peptidet választottunk további MS/MS szekvencia analízisre. Az összes szekvencia megerősítette, hogy a vizsgált anyag valóban Gas6 volt, azaz egyértelműen igazoltuk, hogy a Gas6 jelen van a humán plazmában. Azért, hogy a Gas6-et mérni tudjuk különböző sejt folyadékokból és sejt extraktumokból, egy rendkívül érzékeny ELISA rendszert fejlesztettünk ki. Mivel a plazma Gas6 koncentrációt alacsonynak találtuk, egy további szignál amplifikáció a streptavidin-biotinált torna peroxidáz lépést is beiktattunk. A tesztrendszert tisztított rekombináns Gas6-el standardizáltuk. A teszt szenzitivitási limitje 0,4 µg/mL Gas6 volt és 6,25 µg/mL-ig lineárisnak adódott. Az optimális plazma vagy szérum hígítás 10- illetve 20-szorosnak adódott. A visszanyerés az elméleti 100%-hoz nagyon közel volt, ami arra utal, hogy számottevő zavaró tényező a plazma mintában, illetve a tesztrendszerben nincsen. A protein S-el történő keresztreakciót oly módon zártuk ki, hogy plazma mintához 20 és 40 µg/mL protein S-t adtunk. Ez a protein S körülbelül 1000 - 2000-szeres moláris túlsúlyt jelent a normál Gas6 szinthez képest és körülbelül 200-300%-os növekedést a normál protein S plazma szint fölött. Ez a protein S hozzáadása nem befolyásolta a mért Gas6 szintet. A teszt teljesítőképességének vizsgálata során az intra-assay CV 10% alattinak, míg az inter-assay CV 14% körülnek adódott. A fentebb részletezett ELISA módszert használtuk a Gas6 thrombocyta tartalom mérésére. Hígítatlan, illetve 10-szeresen hígított mintából (1400×10⁹/L koncentrációra beállított nyugvó thrombocyta lizátumból), valamint

aktivált thrombocytá felülúszó vizsgálata során nem tudtunk jelet detektálni. A referencia tartomány meghatározására Gas6 koncentrációt mértünk 94 egészséges egyén citrát antikoagulált plazma mintáján. A megállapított referencia tartomány 13-23 $\mu\text{g/mL}$ -nek adódott. Négy különböző vérvételi csövet teszteltünk 5 önkéntestől, citrát, $\text{K}_3\text{-EDTA}$, lítium-heparin és szérumból, mindegyik használhatónak bizonyult. Azért, hogy a warfarin esetleges Gas6 expresszióra kifejtett hatását megvizsgáljuk, 96 warfarin kezelt betegtől származó plazma mintát teszteltünk. A plazma Gas6 szignifikánsan csökkent volt a kezelt csoportban (átlag 18,0 $\mu\text{g/mL}$ vs. 15,4 $\mu\text{g/mL}$, $p < 0,0001$). A Gas6 szint progresszíven csökkent az emelkedő INR-el. Ezzel a tanulmánnyal egy nagy ellentmondást próbáltunk meg tisztázni. Korábban bemutatták Gas6 jelenlétét patkány, egér és emberi thrombocytákban. Ennek ellenére immunblotting, kombinált immunprecipitáció-immunblotting és egy rendkívül szenzitív és specifikus ELISA módszer kifejlesztését követően sem voltunk képesek a Gas6-et tisztított izolált humán thrombocytákban detektálni. Ezzel szemben a Gas6-et meg tudtuk mérni a humán plazmában teljesen egyértelműen, ugyanezzel az immunprecipitáció-immunoblotting kombinációval. Ha azt feltételezzük, hogy az immunprecipitáció hatékonysága hasonló a plazma és a thrombocytá mintákban, képesek lettünk volna mérni 2 μg Gas6-et 5×10^8 thrombocytában. Ez 2 mL teljes vérekvivalens thrombocytá tartalom ezek szerint kevesebb, mint 2 μg Gas6-et tartalmaz. A visszanyerési kísérletek minden esetben az ELISA módszer működőképességét igazolták. Endogén thrombocytá Gas6-et nem lehetett kimutatni ezekben a thrombocytá mintákban még akkor sem, ha azokat nem hígított formában vizsgáltuk. Az általunk optimalizált tesztrendszer szenzitivitását figyelembe véve azt a konklúziót vontuk le, hogy a Gas6 vagy nincsen jelen a thrombocytákban, vagy a Gas6 a thrombocytákban kevesebb, mint 0,04 ng/ $1,4 \times 10^8$ thrombocytá, ami kb. 1 mL vérben levő thrombocytá tartalom. Amennyiben ez igaz, akkor ki lehet mondani, hogy a vérben keringő Gas6 kevesebb mint 1%-a van jelen a thrombocytákban, azaz habár az ELISA rendszer szenzitivitása akár két nagyságrenddel is nagyobb volt az immunprecipitáció-immunblotting kísérletének, ennek ellenére Gas6-et nem tudtunk kimutatni humán thrombocytákban. Ezen számítások alapján minden thrombocytá kevesebb, mint két Gas6 molekulát tartalmaz, ami a thrombocytá eredetű Gas6 cáfolja bármilyen fiziológiai jelentőségét. Összehasonlításképpen, $1,4 \times 10^8$ thrombocytá kb. 230 ng protein S-t tartalmaz, azaz 12000 protein S molekulát thrombocytánként. Mivel a koncentráció a

plazmában is nagyon alacsony, ezért nagyon kevésbé valószínű, hogy a thrombocyta preparálás során használt plazma kontaminálta volna ezt a mintát. Ismert az, hogy a Gas6 a sejt felszínhez mind N-, mind C-terminálisával tud kötődni. Az N-terminális Gla domén a foszfatidilszerint (PS) tartalmazó foszfolipidekkel, míg a C-terminális SHBG-szerű doménje pedig a TAM receptorokkal kerül interakcióba. A Gas6 a Gla doménjén karboxilálva kell hogy legyen, hogy tudjon funkcionálni *in vitro* és *in vivo*. Valószínű, hogy a Gas6 lokális koncentrációja emelkedik meg PS expozíció során, például az apoptotikus sejtek vagy aktivált thrombocyták felszínén, tehát elképzelhető, hogy az aktivált thrombocyták - habár nem tartalmaznak Gas6-et - képesek a membrán felületükön, illetve az általuk expresszált receptorokon keresztül a Gas6 megkötésére így a lokális környezetben a Gas6 koncentráció valóban megnőhet. Ebben a tanulmányban azt találtuk, hogy a humán vér plazma alacsony koncentrációban tartalmaz Gas6-et (13-23 ng/mL, ami megfelel 160-280 pmol/L-nek), de azt kimutatták már, hogy a Gas6 angiogenezis inhibitor aktivitása még ennél is alacsonyabb (1 ng/mL) koncentrációban is megfigyelhető. Ebben a kontextusban vizsgálva a keringő Gas6 lokálisan akkumuláció hiányában is fontos fiziológiai mediátor lehet. A Wistar patkányok szérumában mért 1-10 ng/mL Gas6 szint jól egyezik a mi eredményeinkkel. Statisztikailag kimutatható csökkenést tapasztaltunk a Gas6 szintekben a warfarin kezelés során, ami arra utal, hogy a warfarin kezelés a Gas6 expressziót vagy szekréciót hasonlóan a többi K-vitamin függő faktorhoz negatívan szabályozza.

Összességében, különböző módszereket használva, amelyek magukba foglalták az immunprecipitációt, a Ba-citrát precipitációt, az immunaffinitás kromatográfiát, tömegspektrometriát, kimutattuk azt, hogy a Gas6 szubnanomoláris koncentrációban jelen van a humán keringésben, ezzel ellentétben nem tudtunk Gas6-et detektálni humán thrombocytában extenzív vizsgálódás ellenére sem, különböző módszerekkel sem, ezért úgy gondoljuk, hogy a Gas6 thrombocyta aggregációban igazolt szerepe az eredetileg a keringésben levő Gas6-nek köszönhető. Ezt követően egy rendkívül szenzitív ELISA immunoassayt fejlesztettünk ki, teszteltünk és bemutattuk azt, hogy a teszt klinikai minták vizsgálatára is tökéletesen alkalmas, ahogy ezt a következő években (posztdoktori periódusom leteltével az én Dahlbäck-laboratóriumból történő távozásom után) született számos publikáció igazolja. Az ELISA teszt egyik első klinikai felhasználásaként egy, a disszertációban nem szereplő a munkánkban összefüggést mutattunk ki a Gas6 szint és a magzati növekedés restrikció közt. Ez

abban az esetben állt fenn, ha abnormalis köldökszinór artéria Doppler értékeket lehet mérni. Ez az eredmény alátámasztotta azt a hipotézisünket, miszerint a Gas6 szerepet játszhat a növekedésben visszafogott magzatok esetén a fiziológiai véráram redistribúcióban. A Gas6 plazma normál tartomány az elmúlt években - először általunk - meghatározásra került, a legtöbb tanulmány szerint 15-65 µg/L között van. Mi nem találtunk fiziológiailag releváns Gas6 mennyiséget a humán thrombocytaiban. Az mRNS detektálható és mások a fehérjét is megtalálni vélték 40 Gas6 molekula per thrombocyta mennyiségben (a mi adataink szerint kevesebb, mint 2 Gas6 molekula per thrombocyta). Mivel ugyanazon tesztrendszer a plazma Gas6 meghatározására többszörösen igazoltan megbízhatóan működik, nincs okunk azt feltételezni, hogy más analitikai képességekkel rendelkező thrombocyta lizátum mérése esetén, sokkal valószínűbb, hogy a thrombocyta-pozitív adatok a rossz minőségű, protein S-sel keresztreakciót adó antitesteknek köszönhetőek (mi ezt megvizsgáltuk és igazoltuk, épp ezért választottunk más antitestet). Abban viszont konszenzus van, hogy a thrombocytára kifejtett Gas6 hatás a plazma Gas6-nek tulajdonítható.

CFH Y402H, LOC387715, HTRA1 és ApoE vizsgálata időskori macula degenerációban

Az *ApoE* gént kivéve mindenhol felülreprezentált volt a betegekben a minor allél. Hat esetben nem volt teljes a kapcsoltság a *HTRA1* és a *LOC387715* polimorfizmusok között. A *CFH* esetében a CC genotípus 7,3-szoros kockázatot jelentett (95%-os fiducia intervallum (95%CI): 2,8-18,7 ($p < 0,001$), míg a legalább egy kockázati allélt hordozók 1,8-szeres kockázatot jelentettek (95%CI: 1,0-3,3; $p = 0,046$) az AMD-re nézve. A homozigóta CC genotípus 4,9-szeres (95%CI: 1,7-14,2; $p = 0,003$) és 10,7-szeres (95%CI: 3,7-31; $p < 0,001$) megnövekedett kockázat a korai és késői AMD-re nézve. A *LOC387715* TT genotípusa 9,1-szeres kockázatot jelent AMD-re nézve (95%CI: 2,9-28,8; $p < 0,001$), 7,4-szeres kockázatot a koraira (95%CI: 2,1-26,2; $p = 0,002$) míg 11,3-szeres kockázatot a későire (95%CI: 3,2-40,4; $p < 0,001$). A *HTRA1* minor allél homozigóták 11,6-szeres kockázatot szenvedtek el az AMD-re nézve (95%CI: 3,2-42,3; $p < 0,001$), míg a legalább egy kockázati allélt hordozók 2,2-szeres kockázattal rendelkeztek (95%CI: 1,2-4; $p = 0,009$). A kockázati allélre nézve homozigóta genotípus 10,1-szeres (95%CI: 2,5-40,8; $p = 0,001$) a koraira, és 13,5-szeres (95%CI: 3,3-55,4; $p < 0,001$) kockázatot jelentett a késői AMD-re nézve. Az ApoE

allélek esetében a kontroll és beteg csoportokban nem volt kimutatható szignifikáns különbség. A dohányzás nem módosította a polimorfizmusok hatását.

Vizsgálataink egyik fő motivációja az volt, hogy megállapítsuk a magyar populációban a fent említett polimorfizmusok előfordulását, mert különböző populációk nagy különbségeket mutatnak ezeknek a genetikai tényezőknek a frekvenciáját illetően és ezáltal az aktuális általuk jelentett kockázat is elképzelhető, hogy különböző populációkban, különböző. Azt találtuk, hogy a polimorfizmusok nagyobb kockázattal bírnak a késői AMD kialakulásában a koraival szemben. Úgy gondoljuk, hogy kifejezettebb hatásuk van a későbbi patogenezis folyamatokat összehasonlítva a korai stádiummal, azaz nem csak a betegség kialakulásában, hanem - hasonlóan más irodalmi adatokhoz - a betegség progressziójában is szerepet játszhatnak.

Összefoglalásképpen megállapítható, hogy a *CFH* és a *LOC387715/HTRA1* génben levő polimorfizmusok Magyarországon markáns kockázati tényezőként szerepelnek AMD kialakulására, különösen a késői formára.

A Gas6 c.834+7G>A és más jelölt gén polimorfizmusok szerepe az AMD kialakulásában

A minor allélek az ismert AMD génekben gyakoribbak voltak a betegekben. A *MerTK* receptor polimorfizmusok (kivéve az rs86016) rendkívül alacsony minor allél frekvenciát mutattak és nem volt kimutatható különbség betegek és kontrollok között. Az *ApoE* esetében E3 allél enyhén magasabb frekvenciával fordult elő a betegekben mint a kontrollokban, míg a potenciális kockázati tényező E2 allél a betegekben alacsonyabb frekvenciával fordul elő a kontrollokhoz képest. Az *ApoE* E4 allél hasonló frekvenciával fordul elő mindkét csoportban. Interakció mind a *C3* és *CFH*, mind a *C3* és *HTRA1* esetében megfigyelhető volt. A *C3* heterozigóta/homozigóta genotípusa szignifikáns kockázatot jelentett vad típussal szemben, de csak akkor, ha a homozigóta *CFH* vagy *HTRA1* polimorfizmus nem volt jelen. Ebben az esetben egy majdnem 5-szörös kockázat volt az esélyhányadosban a száraz típusú AMD esetében (EH: 4,93 (95%CI: 1,98-12,25, p=0,0006)). A *CFH* és *HTRA1* mutáció jelenléte a *C3* vad típus esetében mind száraz, mind nedves AMD-re jelentős kockázatot jelentett, amely kockázat eltűnt a *C3* polimorfizmust nézve hetero-, illetve homozigóta genotípusok esetében a száraz típusú AMD-ben, de megmaradt a szignifikáns kockázat a nedves típusú AMD-ben. Különösen figyelemre méltó összefüggése volt a nedves típusú

AMD-vel a *Gas6*, *CHF* és *HTRA1* géneknek. A *Gas6* rs8191974 polimorfizmus protektívnek adódott teljesen függetlenül attól, hogy milyenek voltak az egyéb genotípusok ($p=0,04$), felére csökkentve a nedves típusú AMD kialakulásának kockázatát. A *HTRA1* hatás módosításra kerül a *C3* genotípus által, a *HTRA1*-ben a homozigóta vs. vad típusú vagy heterozigóta genotípus csoport összehasonlítása során, a kalkulált esélyhányadosok EH: 55,04 (95%CI: 5,30-382,83, $p=0,0005$) a *C3* vad típus esetén míg EH: 4,34 (95%CI: 1,09-17,28, $p=0,04$) a *C3* hetero/homozigóta genotípus esetén. A homozigóta *CFH* polimorfizmus jelentős kockázati tényező a nedves típusú AMD-re, 6-9-szeres kockázatot jelentve attól függően, hogy a *C3*-ban van-e mutáció vagy nincs. A *C3* genotípus érdemleges hatással a *CFH* által jelentett kockázatra - ellentétben a *HTRA1*-el - nincs. A genotípus szerinti megoszlások alapján megállapítottuk, hogy a *Gas6* c.834+7G>A polimorfizmus a *Gas6* szintre nincs hatással. Összességében úgy tűnik, hogy a *C3*-nak fontos szerepe van a száraz AMD kialakulásában, valamint a *CFH* és a *HTRA1* genotípusok lehetnek hatással a *C3* p.Arg102Gly polimorfizmus által kifejtett kockázatra a komplement szabályozó aktivitáson keresztül. Az általunk választott jelölt gén megközelítés a FXIII, *Gas6* és az egyik *Gas6* receptor *MerTK* esetében az alábbi eredményeket adta: a FXIII p.Val34Leu polimorfizmus neutrális mind a száraz, mind a nedves AMD kifejlődésére nézve, a *Gas6* c.834+7G>A polimorfizmusa az összesített korai és késői AMD populációban nem mutatott összefüggést AMD-vel. Amikor a száraz és nedves alcsoportokat külön analizáltuk, egy protektív védő hatást sikerült kimutatni a nedves AMD alcsoportban ($p=0,04$). Mivel az angiogenezis a nedves típusú AMD-nek tipikus sajátossága, ezért lehetséges az, hogy a *Gas6*-nek ezen funkciója értelmezhető a betegség kontextusában. A *Gas6* képes gátolni a VEGF szignalizációt és a metasztázis-indukált angiogenezis gátlásában is szerepe van. Elképzelhető, hogy a *Gas6*-nek van egy fontos negatív szabályzó szerepe a patológiás angiogenezisben, így lehet hatása egy a nedves típusú AMD kialakulására nézve. Összességében az eset kontroll tanulmányunkban sikerült igazolnunk genetikai epistasist a *CFH*, *HTRA1* és *C3* génekben, bemutatva azt, hogy a *C3* polimorfizmus a száraz AMD egy fontos kockázati tényezője, de csak más polimorfizmusoknak a hiányában, viszont a nedves AMD-re nincsen hatása. Ez arra utal, hogy a *C3* inkább a száraz, mint a neovasculáris AMD pathogenezisében játszik szerepet, és a hatása egyértelműen felülírható más, erősebb kockázati tényezők által. Kimutattunk egy protektív hatást a *Gas6* c.834+7G>A

polimorfizmus esetében a nedves AMD-t illetően, viszont a polimorfizmus nincs hatással a keringő Gas6 koncentrációjára, azaz valószínűleg nem befolyásolja a Gas6 splicing folyamatát. Az AMD munkák klinikai koordinálója Dr. Losonczy Gergely volt.

mikroRNS vizsgálatok férfi infertilitásban

Ebben a tanulmányban 11 spermatogenezissel kapcsolatba hozható miRNS (let-7a, miR-7-1-3p, miR-15b, miR-16, miR-34b, miR-122, miR-141, miR-181a, miR-200a, miR-429, miR-449a) szintjét határoztuk meg spermium sejtekben és ondó folyadékban, mind infertilis férfiakban, mind egészséges kontrollokban. A miRNS szintekben a legtöbb esetben az ondó folyadékban alacsonyabbnak találtuk a miRNS relatív expressziót a spermium sejthez viszonyítva. Ez azonban nem volt így a miR-141, miR-181a, miR-200a (asthenozoospermiás csoportban) esetében, míg a miR-34 és miR-122 oligozoospermiás csoport expressziós mintázatában. Öt miRNS esetében statisztikailag kimutatható expresszió növekedés volt az infertilis oligozoospermiás és asthenozoospermiás egyénekben a normozoospermiás kontroll csoporthoz viszonyítva. Robosztusan felülszabályozott miRNS-ek voltak a let-7a, miR-7-1-3p, miR-141, miR-200a és a miR-429 ($p < 0,0001$). A miR-15b, miR-34b és miR-122 esetében alacsonyabb expressziós szintet figyeltünk meg az infertilis egyénekben a normál kontrollhoz viszonyítva mind a spermium sejtekben, mind az ondó folyadékban. A miR-16, miR-181a és miR-449a esetében nem volt a három csoport között statisztikailag kimutatható különbség. Az ondó folyadékban statisztikailag kimutatható különbséget találtunk az oligozoospermiás és normozoospermiás csoportok között: a miR-181a esetében felülszabályozást, míg a miR-16 és 449a esetében alulszabályozást. Statisztikailag szignifikáns negatív korrelációt találtunk a spermium koncentráció és 6 miRNS expresszió szintje (let-7a, miR-7-1-3p, miR-141, miR-181a, miR-200a és miR-429) között mind a spermium sejtekben mind a ondó folyadékban. Egy esettől eltekintve (miR-16) pozitív korrelációt mutattunk ki a spermium koncentráció és 4 miRNS (miR-15b, miR-34b, miR-122 és miR-449) esetében spermiumokban. Szignifikáns pozitív korrelációt mutattunk ki a spermium koncentráció és a miR-15, miR-16b és miR-34b expressziós szintjében az ondó folyadékban. A miRNS-eknek fontos szerepe van a spermatogenezisben. Méréseinkben az ondó folyadék és a spermium sejtek között különbségtételt azért tartottuk szükségesnek, mert az ondófolyadék miRNS-ei csak

részlegesen származhatnak a spermiumból, ugyanis a plazma 90%-a az urogenitális traktus mirigyeiből szekretálódik. A mi tanulmányunk az első, amely különbséget mutat ki a spermium és az ondó folyadék miRNS expressziós szintje között, valamint korrelációt állít fel a spermium sejt koncentráció és a miRNS expressziók között. Mivel a miRNS-ek az érett spermiumban illetve az ondó folyadékban is előfordulnak és az expressziós szintjük egyértelműen különbséget mutat a spermatogenezis problémával szenvedő betegekben, ezért úgy gondoljuk, hogy potenciális biomarkerekként foghatjuk fel a férfi infertilitás diagnózisa és klasszifikációja során. Összefoglalva, ez a 8 felül- vagy alulszabályozott miRNS noninvazív biomarkernek tekinthető.

Y kromoszóma mikrodeléciók Kelet-magyarországi infertilis férfiakban

A 101 azoospermiás férfiből 10 esetben detektáltunk Y kromoszóma mikrodeléciót (9,9%). AZFbc 4 esetben (3,99%), AZFc deléció 6 esetben (5,94%) volt kimutatható. A 246 oligozoospermiás esetben két teljes AZFc mikrodeléciót mutattunk ki (0,8%). A normozoospermiás kontrollok között mikrodeléciót nem detektáltunk. Az AZFbc deléció csak azoospermiás betegekben fordult elő, az AZFc deléció pedig szignifikánsan gyakrabban fordult elő azoospermiás férfiakban oligozoospermiásokkal összehasonlítva, ($p < 0,01$). A következő részleges AZFc deléciókat mutattuk ki: gr/gr (17/458, 3,7%), b2/b3 (12/458, 2,62%), b1/b3 (2/458, 0,44%). A gr/gr és a b2/b3 deléció mind az infertilis, mind a normozoospermiás csoportban előfordult, különböző gyakorisággal. A gr/gr előfordulása az oligozoospermiás csoportban a normozoospermiásokkal összehasonlítva magasabb volt (13/246 (5,3%) vs. 2/111 (1,8%), $p < 0,01$). Az azoospermiás és normozoospermiás gr/gr deléció előfordulásokban nem volt szignifikáns különbség. A gr/gr deléció az oligozoospermiás csoportban gyakrabban fordult elő, mint az azoospermiás csoportban ($p < 0,05$). A b2/b3 deléció előfordulása nem különbözött. A b1/b3 deléciót csak az azoospermiás csoportban tudtuk kimutatni (2/101, 1,98%). Az AZFc régióban részleges duplikációk előfordulása 2,4% volt (11/458), a különböző csoportokban nem volt különbség. Az AZFc régió pontos karakterizálása során meghatároztuk a deletált *DAZ* és *CDY1* génkópiákat. Az infertilis, azoospermiás és oligozoospermiás férfiakban és a normozoospermiás csoportban hasonló Y haplocsoport előfordulást figyeltünk meg. Az AZFa deléciók esetén a megfigyelt fenotípus a Sertoli cell-only syndromától (SCOS) az azoospermiáig terjed. Ezekben az esetekben lehetetlen biopsziás anyagból

spermatozoát nyerni a betegből. Az AZFb és AZFbc teljes deléciók SCOS-t vagy spermatogenezis hibáit okozzák, aminek ugyanígy azoospermia lesz a vége és hasonlóan az AZFa régió delécióhoz, nem lehet biopsziát végezni, spermatozoa nem nyerhető. Az AZFc régió deléciók esetén a klinikai fenotípus rendkívül variábilis, de ezekben az esetekben 50%-os valószínűséggel lehet spermatozooát találni testicularis spermium extrakcióval. AZFbc és AZFc deléciókat kizárólag azoospermiás és súlyosan oligozoospermiás betegekben definiáltuk. Ezek az adatok arra utalnak, hogy az Y kromoszóma mikrodeléciók vizsgálata a testicularis spermium extrakció előtt ajánlott, a szükségtelen, bizonyosan eredménytelen módszer kivitelezésének elkerülése céljából. A részleges AZFc deléciók esetén a genotípus/fenotípus korrelációk lényegesen komplexebbek a teljes AZFc delécióhoz képest. A gr/gr és b2/b3 deléciók kimutathatók normozoospermiás egyénekben, ami arra utal, hogy nincs meghatározó szerepük a spermatogenezisben, de tény, hogy a gr/gr deléciót hordozó egyének esetében magasabb az oligozoospermia kockázata. A mi vizsgálati kohorszunkban a gr/gr deléció szignifikánsan magasabb frekvenciával fordult elő az oligozoospermiás csoportban a kontroll csoporthoz képest. A gr/gr deléció és a spermium koncentráció közötti kapcsolat nem egyértelmű. A klinikai genetikai tanácsadás szempontjából fontos tény, hogy a részleges AZFa, AZFb és AZFc deléciók örökíthetők. Jelentősége abban áll, hogy potenciális kockázat az utódok esetében a Turner szindróma, mert bizonyos AZFa deléciók jelenléte a teljes Y kromoszóma instabilitásával járhat, amely Y kromoszóma vesztéssel a 45,X sejtvonallá alakulhat, ami eredményezheti. Az infertilis esetekben elvégzendő genetikai vizsgálatok a kariotípuson túl az Y kromoszóma AZF mikrodeléciók vizsgálatát is magukban foglalják. A mikrodeléciók vizsgálata az $5 \times 10^6/\text{mL}$ spermiumkoncentráció alatt ajánlott, ezeknek a vizsgálatoknak mind diagnosztikus mind prognosztikus jelentőségük lehet, és a megfelelő spermium kinyerési eljárások meghatározásában is szerepük van. Az infertilitással kapcsolatos méréseket Dr. Mokánszki Attila végezte.

ÚJ MEGÁLLAPÍTÁSOK

1. Egyedi klinikai kérdésekre kerestünk választ genetikai módszerekkel. Öröklött faktor V hiányos betegben a FV deficienciát két olvasási keret eltolódást okozó mutáció összetett heterozigóta *transz* szegregációja okozta. Eredményeink lehetőséget nyújtottak célzott prenatális diagnosztikára. Sikeresen tártuk fel NPC betegség molekuláris hátterét. A genetikai diagnózis személyre szabott kezelést eredményezett. Három glükóz metabolizmust érintő gén mutációt és következményüket vizsgáltuk. A *HNF1A*-MODY esetében a genetikai vizsgálat az inzulin kezelés elhagyását eredményezte, a hyperinsulinismus esetében a genetikai eredmény a fokális formát valószínűsítette, míg eredményeink szerint a sulfonylureák inzulin alternatívaként szerepelhetnek a *KCNJ11* mutációt hordozó neonatális diabeteses várandós nők esetében. Új misszensz mutációt írtunk le dystrophinopathiában.

2. Klinikai laboratóriumi genetikai módszerfejlesztést és evaluációt végeztünk. Megvizsgáltuk a leggyakrabban használt molekuláris genetikai diagnosztikai módszerek érzékenységét anyai sejt kontaminációra, ami kritikus fontosságú az invazív mintavételt követő prenatális diagnosztika során. Megállapítottuk egy új generációs DNS szekvenálási rendszer, a piroszekvenálás homopolimerek detektálását illető analitikai teljesítőképességét.

3. Különböző módszereket használva felmértük magyar CF kohorszok mutáció spektrumát. Két, a magyar populációban korábban nem vizsgált mutáció meglepően magas frekvenciával fordult elő. Eredményeink alapján lehetővé válik mutáció vizsgálati panel kialakítása, kidolgozható molekuláris genetikai diagnosztikai stratégia újszülöttkori szűrőprogram és genotípus alapú mutáció-specifikus kezelés esetén.

4. Felmértük a magyar SLO betegek mutáció spektrumát. Kimutattuk, hogy az SLO esetében a nonszensz-mediálta mRNS lebomlás jelenségét fehérvérsejtekből izolált mRNS-ben is lehet igazolni. Biomarkerek segítségével genotípus-fenotípus összefüggéseket állítottunk fel, és eredményeink alapján 9 esetben végeztünk célzott prenatális diagnosztikát. Nemzetközi kollaborációban kimutattuk kis molekulásúlyú anyagok 7-DHC szintre kifejtett hatását. Kimutattuk, hogy az aripiprazole és trazodone

kezelés szignifikánsan megemeli a 7-DHC szintet heterozigóta fibroblasztokban, azaz a gyógyszerek valamelyikét szedő várandós heterozigóta nők potenciálisan veszélyeztetettek, mert esetükben a 7-DHC szint toxikus tartományba emelkedhet.

5. 36 betegből álló ARPKD kohorsz vizsgálatát végeztük el, 27 beteg esetén biallélikus *PKHD1* mutációt, 8 beteg esetén fenokópiát mutattunk ki. Indirekt genetikai diagnosztikát végeztünk 6 obligát heterozigóta pár esetén.

6. Az első hazai nagy, 26 betegből álló Marfan genetikai kohorsz genetikai analízisét végeztük el. 7 új mutációt írtunk le. Megállapítottuk, hogy egy kivételtől eltekintve a magyar betegekben mutációs forró pont nincs, így mindenkor a teljes gén vizsgálat indokolt. Eredményeink hozzájárulnak a megfelelő interpretációs protokoll kialakításához az egyre inkább teret nyerő exom/genom szekvenálási alapú klinikai laboratóriumi genetikai diagnosztika esetében, ugyanis a Marfan szindróma részét képezi az exom/genom szekvenálás során kötelezően vizsgálandó véletlen találati listának.

7. Elsőként mutattuk ki a Gas6 jelenlétét humán vérplazmában bárium citrát precipitáció, immunblotting és tömegspektrometria használatával. ELISA módszert fejlesztettünk a Gas6 mennyiségi meghatározására. Felállítottuk a plazma Gas6 referencia tartományát. Kimutattuk, hogy Gas6 nincs jelen a humán thrombocytákban biológiailag értelmezhető mennyiségben. Megállapítottuk, hogy - hasonlóan több K-vitamin függő fehérjéhez - a plazma Gas6 koncentráció csökken tartós antikoaguláció esetén és magasabb INR nagyobb mértékű csökkenéssel jár.

8. Megállapítottuk, hogy a *CFH*, *LOC387715* és *HTRA1* gének polimorfizmusai erős kockázati tényezők a magyar AMD betegekben, míg az *apoE* allélek nem. Az általuk jelentett kockázatnövekedés elsősorban a polimorfizmusok homozigóta formájában jelentkeznek és erőteljesebb a betegség késői stádiumaiban. Genetikai interakciót igazoltunk a *CFH*, *HTRA1* és *C3* génekben, kimutattuk, hogy a *C3* rs2230199 polimorfizmus a száraz AMD egy fontos kockázati tényezője, de csak más polimorfizmusoknak a hiányában, viszont a nedves AMD-re nincsen hatása. Kimutattunk egy protektív hatást a *Gas6* c.834+7G>A polimorfizmus esetében a

nedves AMD-t illetően, viszont a polimorfizmus nincs hatással a keringő Gas6 koncentrációjára.

9. Férfi infertilitást vizsgáltunk szerkezeti és funkcionális szempontból. Y kromoszóma mikrodeléciókat mutattunk ki azoospermiás férfiakban. Különbséget mutattunk ki a spermium és az ondó folyadék miRNS expressziós szintje között, valamint korrelációt állítottunk fel a spermium sejt koncentráció és bizonyos miRNS expressziók között.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Pályámon Muszbek László akadémikus indított el, nagyon köszönöm neki. Külön hálás vagyok azért, mert segítette azt, hogy megtaláljam saját utamat. Köszönöm Kappelmayer János professzornak a folyamatos támogatást, a jó munkahelyi légkört, de leginkább a végtelen emberségességét. Köszönöm Björn Dahlbäck professzornak azt a két évet, amit Svédországban tölthettem, felejthetetlen tapasztalatként. Köszönettel tartozom a külföldi kollaborátoroknak, Mirnics Károly, Ned Porter, Milan Macek, Margarida Amaral, Zeljka Korade, Maurizio Scarpa professzoroknak a gyümölcsöző együttműködésekért.

Nagy szerencsém, hogy munkámat kiváló klinikus kollégákkal végezhetem. A betegekhez való odafordulásuk, alázatuk, a velük való mindig stimuláló eszmecserék, az évek során kivívott tisztelet és nem egy esetben barátság folyamatos motivációt eredményez. A teljesség igénye nélkül, köszönöm ezt Dr. Gaál Zsoltnak, Dr. Pfliegler Györgynek, Dr. P. Szabó Gabriellának, Dr. Szabó Tamásnak, Dr. Szakszon Katalinnak, Dr. Török Olgának és Dr. Tory Kálmánnak. Köszönöm azoknak, akik engem választottak diplomamunka vagy TDK témavezetőjüknek, Dr. Fekete Ágnesnek, Dr. Ivády Gergelynek, Dr. Losonczy Gergelynek. Különösen azoknak, akik velem maradtak, Dr. Koczok Katalinnak, Madar Lászlónak a sok közös munkát, a jó ötleteket, az alaposságot, a pontosságot. Köszönöm a segítséget a disszertációhoz laboratóriumi munkával vagy adminisztratív segítséggel hozzájárulóknak, Dzsudzsák Erikának, Gombos Évának, Páldeák Dorkának, Kópis Ildikónak és az évek során velem dolgozó valamennyi asszisztensnek, analitikusnak. Köszönöm a belső kollaborátoroknak, jelenlegi és korábbi munkacsoporttagoknak, Dr. Bessenyei Beátának, Dr. Mokánszki Attilának, Dr. Nagy Bélának, Dr. Oláh Annának, Dr. Orosz Orsolyának, Dr. Ujfalusi Anikónak, Szűcs Zsuzsannának. Nem juthattam volna el ide Dr. Ajzner Éva szerető támogatása nélkül, köszönöm. Köszönöm a barátaimnak, Dr. Bereczki Gézának, Bogár Jánosnak, Kovács Istvánnak, Olajos Péternek, hogy ott voltak, amikor szükségem volt rájuk. Sokat jelentett nekem az évek során Dr. Kern József bizalma, az emlékezetes beszélgetések. Végül azoknak köszönöm, akik azzá tettek és tesznek, aki vagyok. A szüleimnek, a testvéremnek, a fiaimnak és a feleségemnek. Soha nem tudom ezt meghálálni.

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

1. Ajzner E, **Balogh I**, Szabo T, Marosi A, Haramura G, Muszbek L. Severe coagulation factor V deficiency caused by 2 novel frameshift mutations: 2952delT in exon 13 and 5493insG in exon 16 of factor 5 gene. *Blood* 2002;99:702-5. IF: 9,631
2. **Balogh I**, Hafizi S, Stenhoff J, Hansson K, Dahlback B. Analysis of Gas6 in human platelets and plasma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:1280-6. IF: 7,053
3. Ivady G, Madar L, Nagy B, Gonczi F, Ajzner E, Dzsudzsak E, Dvorakova L, Gombos E, Kappelmayer J, Macek M, Jr., **Balogh I**. Distribution of CFTR mutations in Eastern Hungarians: relevance to genetic testing and to the introduction of newborn screening for cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2011;10:217-20. IF: 3,190
4. Losonczy G, Fekete A, Voko Z, Takacs L, Kaldi I, Ajzner E, Kasza M, Vajas A, Berta A, **Balogh I**. Analysis of complement factor H Y402H, LOC387715, HTRA1 polymorphisms and ApoE alleles with susceptibility to age-related macular degeneration in Hungarian patients. *Acta Ophthalmol* 2011;89:255-62. IF: 2,629
5. Gaal Z, Klupa T, Kantor I, Mlynarski W, Albert L, Tolloczko J, **Balogh I**, Czajkowski K, Malecki MT. Sulfonylurea use during entire pregnancy in diabetes because of KCNJ11 mutation: a report of two cases. *Diabetes Care* 2012;35:e40.
6. **Balogh I**, Koczok K, Szabo GP, Torok O, Hadzsiev K, Csabi G, Balogh L, Dzsudzsak E, Ajzner E, Szabo L, Csakvary V, Olah AV. Mutational spectrum of Smith-Lemli-Opitz syndrome patients in Hungary. *Mol Syndromol* 2012;3:215-22.
7. Losonczy G, Vajas A, Takacs L, Dzsudzsak E, Fekete A, Marhoffer E, Kardos L, Ajzner E, Hurtado B, de Frutos PG, Berta A, **Balogh I**. Effect of the Gas6 c.834+7G>A polymorphism and the interaction of known risk factors on AMD pathogenesis in Hungarian patients. *PLoS One* 2012;7:e50181. IF: 3,730
8. Olah AV, Szabo GP, Varga J, Balogh L, Csabi G, Csakvary V, Erwa W, **Balogh I**. Relation between biomarkers and clinical severity in patients with Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Eur J Pediatr* 2013;172:623-30. IF: 1,983
9. Szakszon K, Szegedi I, Magyar A, Olah E, Andrejkovics M, Balla P, Lengyel A, Berenyi E, **Balogh I**. Complete recovery from psychosis upon miglustat treatment in a juvenile Niemann-Pick C patient. *Eur J Paediatr Neurol* 2014;18:75-8. IF: 2,301
10. Koczok K, V. Olah A, P. Szabo G, Olah E, Torok O, **Balogh I**. A koleszterin-bioszintézis veleszületett zavara: a Smith-Lemli-Opitz-szindróma. *Orv Hetil* 2015;156:1695-702. IF: 0,291
11. Ivady G, Koczok K, Madar L, Gombos E, Toth I, Gyori K, **Balogh I**. Molecular Analysis of Cystic Fibrosis Patients in Hungary - An Update to the Mutational Spectrum. *J Med Biochem* 2015;34:46-51. IF: 0,742
12. Jermendy G, **Balogh I**, Gaal Z. HNF-4- α -mutáció okozta monogén diabetes mellitus (MODY-1) első hazai esete. *Orv Hetil* 2016;157:469-73. IF: 0,349

13. Korade Z, Kim HY, Tallman KA, Liu W, Koczok K, **Balogh I**, Xu L, Mirnics K, Porter NA. The Effect of Small Molecules on Sterol Homeostasis: Measuring 7-Dehydrocholesterol in Dhcr7-Deficient Neuro2a Cells and Human Fibroblasts. *J Med Chem* 2016;59:1102-15. IF: 6,259
14. Korade Z, Genaro-Mattos TC, Tallman KA, Liu W, Garbett KA, Koczok K, **Balogh I**, Mirnics K, Porter NA. Vulnerability of DHCR7(+/-) mutation carriers to aripiprazole and trazodone exposure. *J Lipid Res* 2017;58:2139-46. IF: 4,505
15. Molnar Z, Balogh L, Kappelmayer J, Madar L, Gombos E, **Balogh I**. Congenital Hyperinsulinism Caused by a De Novo Mutation in the ABCC8 Gene - A Case Report. *EJIFCC* 2017;28:85-91.
16. Koczok K, Mero G, Szabo GP, Madar L, Gombos E, Ajzner E, Motyan JA, Hortobagyi T, **Balogh I**. A novel point mutation affecting Asn76 of dystrophin protein leads to dystrophinopathy. *Neuromuscul Disord* 2018;28:129-36. IF: 2,612
17. Ivady G, Madar L, Dzsudzsak E, Koczok K, Kappelmayer J, Krulisova V, Macek M, Jr., Horvath A, **Balogh I**. Analytical parameters and validation of homopolymer detection in a pyrosequencing-based next generation sequencing system. *BMC Genomics* 2018;19:158. IF: 3,501
18. Koczok K, Gombos E, Madar L, Torok O, **Balogh I**. Interfering effect of maternal cell contamination on invasive prenatal molecular genetic testing. *Prenat Diagn* 2018;38:713-9. IF: 2,434
19. Mokanszki A, Ujfalusi A, Gombos E, **Balogh I**. Examination of Y-Chromosomal Microdeletions and Partial Microdeletions in Idiopathic Infertility in East Hungarian Patients. *J Hum Reprod Sci* 2018;11:329-36.
20. Szabo T, Orosz P, Balogh E, Javorszky E, Mattyus I, Bereczki C, Maroti Z, Kalmar T, Szabo AJ, Reusz G, Varkonyi I, Marian E, Gombos E, Orosz O, Madar L, Balla G, Kappelmayer J, Tory K, **Balogh I**. Comprehensive genetic testing in children with a clinical diagnosis of ARPKD identifies phenocopies. *Pediatr Nephrol* 2018;33:1713-21. IF: 2,816
21. Madar L, Szakszon K, Pfliegler G, Szabo GP, Brugos B, Ronen N, Papp J, Zahuczky K, Szakos E, Fekete G, Olah E, Koczok K, **Balogh I**. FBN1 gene mutations in 26 Hungarian patients with suspected Marfan syndrome or related fibrillinopathies. *J Biotechnol* 2019;301:105-11. IF: 3,163
22. Mokanszki A, Molnar Z, Varga Tothne E, Bodnar B, Jakab A, Balint BL, **Balogh I**. Altered microRNAs expression levels of sperm and seminal plasma in patients with infertile ejaculates compared with normozoospermic males. *Hum Fertil (Camb)* 2019:1-10. IF: 1,803

AZ ÉRTEKEZÉSBEN NEM TÁRGYALT NEMZETKÖZI ÉS HAZAI KÖZLEMÉNYEK

1. Poka R, Ajzner E, **Balogh I**. Public health approach to activated protein C resistance assay. *Am J Obstet Gynecol* 1997;177:1271-2.
2. Poka R, **Balogh I**, Ajzner E, Nagy IG. Orális fogamzásgátlás thromboemboliás szövődményeinek megelőzése: módszertani javaslat. *Orv Hetil* 1998;139:815-8.
3. Regéczy N, Kiss E, **Balogh I**, Kappelmayer J, Muszbek L, Szegedi Gy. Öröklött és szerzett thrombophilia együttes előfordulása egy systemás lupus erythematosusban szenvedő betegben: esetismertetés. *Magyar Reumatológia* 1998;39:105-8.
4. Szőke G, Bereczky Zs, **Balogh I**, Muszbek L. Homocisztein anyagcsere laboratóriumi vizsgálata és klinikai jelentősége a thrombosis hajlam megítélése szempontjából. I. Homocisztein metabolizmus és a plazma homocisztein szintjének a meghatározása. *Klinikai és Kísérletes Laboratóriumi Medicina* 1999;26:8-14.
5. Bereczky Zs, **Balogh I**, Szőke G, Muszbek L. Homocisztein anyagcsere laboratóriumi vizsgálata és klinikai jelentősége a thrombosis hajlam megítélése szempontjából. II. Öröklött és szerzett hyperhomocysteinaemiák. *Klinikai és Kísérletes Laboratóriumi Medicina* 1999;26:54-63.
6. **Balogh I**, Poka R, Losonczy G, Muszbek L. High frequency of factor V Leiden mutation and prothrombin 20210A variant in Romanies of Eastern Hungary. *Thromb Haemost* 1999;82:1555-6. IF: 4,983
7. **Balogh I**, Poka R, Pfliegler G, Dekany M, Boda Z, Muszbek L. High prevalence of factor V Leiden mutation and 20210A prothrombin variant in Hungary. *Thromb Haemost* 1999;81:660-1. IF: 4,983
8. Szakony S, **Balogh I**, Muszbek L. The frequency of the haemochromatosis C282Y mutation in the ethnic Hungarian and Romany populations of eastern Hungary. *Br J Haematol* 1999;107:464-5. IF: 3,204
9. **Balogh I**, Szoke G, Karpati L, Wartiovaara U, Katona E, Komaromi I, Haramura G, Pfliegler G, Mikkola H, Muszbek L. Val34Leu polymorphism of plasma factor XIII: biochemistry and epidemiology in familial thrombophilia. *Blood* 2000;96:2479-86. IF: 8,977
10. Bare SN, Poka R, **Balogh I**, Ajzner E. Factor V Leiden as a risk factor for miscarriage and reduced fertility. *Aust N Z J Obstet Gynaecol* 2000;40:186-90. IF: 0,523
11. Karpati L, Penke B, Katona E, **Balogh I**, Vamosi G, Muszbek L. A modified, optimized kinetic photometric assay for the determination of blood coagulation factor XIII activity in plasma. *Clin Chem* 2000;46:1946-55. IF: 4,261

12. Regeczy N, **Balogh I**, Lakos G. Risk for venous thrombosis in autoimmune diseases with antiphospholipid antibodies and factor V Leiden mutation among Hungarian patients. *J Rheumatol* 2000;27:2723-5.
13. Regeczy N, **Balogh I**, Lakos G, Zeher M, Bodolay E, Szucs G, Kiss E, Ajzner E, Szegedi G. Hypercoagulability in various autoimmune diseases: no association with factor V Leiden mutation. *Haematologia (Budap)* 2000;30:35-9. IF: 0,405
14. Regeczy N, Lakos G, **Balogh I**, Ajzner E, Kiss E, Szegedi G. The Leiden mutation of coagulation factor V in Hungarian SLE patients. *Clin Appl Thromb Hemost* 2000;6:41-5. IF: 0,567
15. Regeczy N, Lakos G, **Balogh I**, Kappelmayer J, Kiss E. Membranous glomerulonephritis in a patient with inherited activated protein C resistance. *Clin Nephrol* 2000;53:390-3. IF: 1,638
16. Wartiovaara U, Mikkola H, Szoke G, Haramura G, Karpati L, **Balogh I**, Lassila R, Muszbek L, Palotie A. Effect of Val34Leu polymorphism on the activation of the coagulation factor XIII-A. *Thromb Haemost* 2000;84:595-600. IF: 4,732
17. Póka R, Kiss E, **Balogh I**, Ajzner E. Hormonális fogamzásgátlás, gesztációs események és a Leiden-mutáció előfordulása mélyvénás thrombosis miatt kezelt betegek között. *Magyar Nőorvosok Lapja* 2001;64:191-5.
18. Hunter M, Heyer E, Austerlitz F, Angelicheva D, Nedkova V, Briones P, Gata A, de Pablo R, Laszlo A, Bosshard N, Gitzelmann R, Tordai A, Kalmar L, Szalai C, **Balogh I**, Lupu C, Corches A, Popa G, Perez-Lezaun A, Kalaydjieva LV. The P28T mutation in the GALK1 gene accounts for galactokinase deficiency in Roma (Gypsy) patients across Europe. *Pediatr Res* 2002;51:602-6. IF: 3,382
19. Ajzner E, **Balogh I**, Haramura G, Boda Z, Kalmar K, Pfliegler G, Dahlback B, Muszbek L. Anti-factor V auto-antibody in the plasma and platelets of a patient with repeated gastrointestinal bleeding. *J Thromb Haemost* 2003;1:943-9.
20. Bors A, Andrikovics H, Kalmar L, Erdei N, Galambos S, Losonczi A, Furedi S, **Balogh I**, Szalai C, Tordai A. Frequencies of two common mutations (c.35delG and c.167delT) of the connexin 26 gene in different populations of Hungary. *Int J Mol Med* 2004;14:1105-8. IF: 3,190
21. Herman T, Vad Sz, Ajzner É, **Balogh I**, Boda Z, Pfliegler Gy, Póka R. Terhességi és gyermekági thrombosis kockázatát befolyásoló tényezők faktor V Leiden-hordozók körében: Szelektív profilaxis indikációi. *Magyar Nőorvosok Lapja* 2004;67:299-305.
22. Nagy V, Facsko A, Takacs L, Balazs E, Berta A, **Balogh I**, Edes I, Czuriga I, Pfliegler G. Activated protein C resistance in anterior ischaemic optic neuropathy. *Acta Ophthalmol Scand* 2004;82:140-3. IF: 0,974
23. Losonczy G, Rosenberg N, Kiss C, Kappelmayer J, Vereb G, Kerenyi A, **Balogh I**, Muszbek L. A novel homozygous mutation (1619delC) in GPIIb gene associated with

Glanzmann thrombasthenia, the decay of GPIIb-mRNA and the synthesis of a truncated GPIIb unable to form complex with GPIIIa. *Thromb Haemost* 2005;93:904-9.

IF: 3,056

24. Poka R, Vad S, **Balogh I**, Ajzner E. Variable effect of prothrombotic factors on fetomaternal circulation. *Am J Obstet Gynecol* 2005;193:2180-1.

25. Egyed B, Furedi S, Angyal M, **Balogh I**, Kalmar L, Padar Z. Analysis of the population heterogeneity in Hungary using fifteen forensically informative STR markers. *Forensic Sci Int* 2006;158:244-9.

IF: 1,397

26. Erdos M, Alapi K, **Balogh I**, Oroszlan G, Rakoczi E, Sumegi J, Marodi L. Severe Shwachman-Diamond syndrome phenotype caused by compound heterozygous missense mutations in the SBDS gene. *Exp Hematol* 2006;34:1517-21.

IF: 3,408

27. Nagy B, Jr., Csongradi E, Bhattoa HP, **Balogh I**, Blasko G, Paragh G, Kappelmayer J, Kaplar M. Investigation of Thr715Pro P-selectin gene polymorphism and soluble P-selectin levels in type 2 diabetes mellitus. *Thromb Haemost* 2007;98:186-91.

IF: 3,501

28. Takacs L, Losonczy G, Matesz K, **Balogh I**, Sohajda Z, Toth K, Fazakas F, Vereb G, Berta A. TGFBI (BIGH3) gene mutations in Hungary--report of the novel F547S mutation associated with polymorphic corneal amyloidosis. *Mol Vis* 2007;13:1976-83.

IF: 2,329

29. Jiao H, Toth B, Erdos M, Fransson I, Rakoczi E, **Balogh I**, Magyarics Z, Derfalvi B, Csorba G, Szaflarska A, Megarbane A, Akatcharian C, Dbaiibo G, Rajnavolgyi E, Hammarstrom L, Kere J, Lefranc G, Marodi L. Novel and recurrent STAT3 mutations in hyper-IgE syndrome patients from different ethnic groups. *Mol Immunol* 2008;46:202-6.

IF: 3,555

30. Harangi M, **Balogh I**, Harangi J, Paragh G. A koleszterinfelszívódás hatékonyságának genetikai háttere. A Niemann-Pick C1-like-1 receptor és génvariációinak szerepe a lipidanyagcserében. *Orv Hetil* 2010;151:1376-83.

31. Lindqvist PG, **Balogh I**, Dahlback B. Umbilical cord plasma levels of growth-arrest specific protein 6 in intrauterine growth restriction. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2010;89:22-6.

IF: 1,860

32. Imre L, **Balogh I**, Kappelmayer J, Szabo M, Melegh B, Wanker E, Szabo G. Detection of mutations by flow cytometric melting point analysis of PCR products. *Cytometry A* 2011;79:720-6.

IF: 3,729

33. Pál földi R, Szabó T, Somfay A, **Balogh I**. Késői diagnózis? *Medicina Thoracalis* (Budapest) 2011;64:219-23.

34. Szima GZ, Mihaly E, Ajzner E, **Balogh I**, Vad Sz, Poka R. Az APC rezisztens nők császármetszési szülési vérvesztése kevesebb, mint a vad típusúaké: a Leiden-mutáció populáció genetikai előnyének első közvetlen bizonyítéka. *Magyar Nőorvosok Lapja* 2011;74:14-8.

35. Balicza P, Bereznai B, Takats A, Klivenyi P, Dibo G, Hidasi E, **Balogh I**, Molnar MJ. Az LRRK2 gyakori G2019S-mutációjának hiánya 120, korai kezdetű magyar Parkinson-beteg esetében. *Ideggyogy Sz* 2012;65:239-42.
36. Szakszon K, Felszeghy E, Csizy I, Jozsa T, Kaposzta R, Balogh E, Olah E, **Balogh I**, Berenyi E, Knekt AC, Ilyes I. Endocrine and anatomical findings in a case of Solitary Median Maxillary Central Incisor Syndrome. *Eur J Med Genet* 2012;55:109-11. IF: 1,685
37. Torok O, Toth B, Erdos M, Csorba G, Gyimesi E, **Balogh I**, Toth Z, Marodi L. Molecular Diagnostic Challenges and Complex Management of Consecutive Twin Pregnancies in a Family with CD40 Ligand Deficiency. *Scand J Immunol* 2012;75:227-30. IF: 2,199
38. Mokánszki A, Ujfalusi A, Balogh E, Sümegi A, **Balogh I**, Bodnár B, Varga A, Oláh É; Tóthné VE. Az Y-kromoszóma mikrodelécióinak és parciális mikrodelécióinak vizsgálata idiopátiás infertilitásban. *Magyar Andrológia* 2012;17:17-21.
39. Harangi M, Seres I, **Balogh I**, Kobling T, Harangi J, Varga J, Mark L, Paragh G. Effect of apolipoprotein E genotypes on the efficacy of ezetimibe monotherapy in patients with statin induced adverse effects. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2013;51:746-52. IF: 1,044
40. Toth B, Pistar Z, Csorba G, **Balogh I**, Kovacs T, Erdos M, Marodi L. Novel dedicator of cytokinesis 8 mutations identified by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Eur J Haematol* 2013;91:369-75. IF: 2,414
41. **Balogh I**, Bálint BL. DNS-szekvenálás a gén és a genom szintjén. *Gyermekgyógyászat* 2013;64:110-1.
42. Gaál Zs, Bakó B, Gárdus D, Gaál B, Spisák N, **Balogh I**. Neonatalis diabetes hátterének felnőttkori identifikálása. *Diabetologia Hungarica* 2013;21:7-14.
43. Helisalmi S, Immonen I, Losonczy G, Resch MD, Benedek S, **Balogh I**, Papp A, Berta A, Uusitupa M, Hiltunen M, Kaarniranta K. ADAMTS9 locus associates with increased risk of wet AMD. *Acta Ophthalmol* 2014;92:e410. IF: 2,844
44. Kapas I, Katko M, Harangi M, Paragh G, **Balogh I**, Koczi Z, Regelsberger G, Molnar MJ, Kovacs GG. Cerebrotendinous xanthomatosis with the c.379C>T (p.R127W) mutation in the CYP27A1 gene associated with premature age-associated limbic tauopathy. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2014;40:345-50. IF: 3,927
45. Szakszon K, Balogh E, Ujfalusi A, Bessenyei B, P. Szabo G, **Balogh I**, Olah E. Ritka genetikai betegségek klinikai és genetikai diagnosztikájában szerzett tapasztalataink a kelet-magyarországi régióban (2007-2013). *Orv Hetil* 2014;155:348-57.
46. Varga VE, Katko M, Harangi J, **Balogh I**, Kapas I, Madar L, Seres I, Molnar MJ, Paragh G, Kovacs GG, Harangi M. Egy ritka, veleszületett neurodegeneratív betegség:

a cerebrotendinosus xanthomatosis laboratóriumi diagnosztikája. Orv Hetil 2014;155:811-6.

47. Zsiros N, Bodor M, Varga V, Berta E, **Balogh I**, Seres I, Paragh G, Harangi M. The c.-133A>G polymorphism in NPC1L1 gene influences the efficacy of ezetimibe monotherapy on apolipoprotein A1 in hyperlipidemic patients. Pharmazie 2014;69:424-9. IF: 1,052

48. Beke A, Jaeger J, Erős FR, Nagy GyR, Varga P, Berecz B, Kovalszky I, Rác G, Nagy B, Madar L, Kappelmayer J, Rigó J, **Balogh I**. X-kromoszómához kötött öröklődést mutató ornitin-transzkarbamiláz- (OTC-) hiány kimutatása újszülöttkori súlyos hyperammonaemia hátterében molekuláris genetikai vizsgálattal. Gyermekgyógyászat 2014;65:104-9.

49. Bodnár A, Gaál Zs, **Balogh I**, Kántor I, Károlyi H, Karádi Zs, Winkler G. A MODY-kalkulátor értéke a monogén diabetesformák predictiójában. Diabetologia Hungarica 2014;22:33-8.

50. Orosz O, Czegledi M, Kantor I, **Balogh I**, Vajas A, Takacs L, Berta A, Losonczy G. Ophthalmological phenotype associated with homozygous null mutation in the NEUROD1 gene. Mol Vis 2015;21:124-30. IF: 2,110

51. V. Oláh A, P. Szabó G, Varga J, Koczok K, **Balogh I**, Harangi J. A veleszületett koleszterinhiány jellemző biomarkerei Smith-Lemli-Opitz-szindrómás betegekben és hordozókban. Metabolizmus 2015;13:196-201.

52. Csillik A, Pozsonyi Z, Soos K, **Balogh I**, Bodo I, Aranyi Z. Transthyretin familiáris amyloid polyneuropathia - három magyarországi eset ritka mutációkkal (His88Arg és Phe33Leu) = Transthyretin familial amyloid polyneuropathy – three hungarian cases with rare mutations (His88Arg and Phe33Leu). Ideggyogy Sz 2016;69:245-53.

53. Mizzi C, Dalabira E, Kumuthini J, Dzimir N, **Balogh I**, Basak N, Bohm R, Borg J, Borgiani P, Bozina N, Bruckmueller H, Burzynska B, Carracedo A, Cascorbi I, Deltas C, Dolzan V, Fenech A, Grech G, Kasiulevicius V, Kadasi L, Kucinskas V, Khusnutdinova E, Loukas YL, Macek M, Jr., Makukh H, Mathijssen R, Mitropoulos K, Mitropoulou C, Novelli G, Papantoni I, Pavlovic S, Saglio G, Setric J, Stojiljkovic M, Stubbs AP, Squassina A, Torres M, Turnovec M, van Schaik RH, Voskarides K, Wakil SM, Werk A, Del Zompo M, Zukic B, Katsila T, Lee MT, Motsinger-Rief A, McLeod HL, van der Spek PJ, Patrinos GP. A European Spectrum of Pharmacogenomic Biomarkers: Implications for Clinical Pharmacogenomics. PLoS One 2016;11:e0162866. IF: 2,806

54. Nagy B, Jr., Nagy B, Fila L, Clarke LA, Gonczy F, Bede O, Nagy D, Ujhelyi R, Szabo A, Anghelyi A, Major M, Bene Z, Fejes Z, Antal-Szalmas P, Bhattoa HP, Balla G, Kappelmayer J, Amaral MD, Macek M, Jr., **Balogh I**. Human Epididymis Protein 4: A Novel Serum Inflammatory Biomarker in Cystic Fibrosis. Chest 2016;150:661-72. IF: 6,147

55. Iván G, **Balogh I**, Gaál Zs, Mosonyi J, Szajbert T. Három évtizedes inzulinkezelés után diagnosztizált HNF1A-MODY (MODY 3) esete - Hogyan tovább? Diabetologia Hungarica 2016;24:48-52.

56. Orosz O, Rajta I, Vajas A, Takacs L, Csutak A, Fodor M, Kolozsvári B, Resch M, Senyi K, Lesch B, Szabo V, Berta A, **Balogh I**, Losonczy G. Myopia and Late-Onset Progressive Cone Dystrophy Associate to LVAVA/MVAVA Exon 3 Interchange Haplotypes of Opsin Genes on Chromosome X. Invest Ophthalmol Vis Sci 2017;58:1834-42. IF: 3,388

57. Zadori D, Szpisjak L, Madar L, Varga VE, Csanyi B, Bencsik K, **Balogh I**, Harangi M, Kereszty E, Vecsei L, Klivenyi P. Different phenotypes in identical twins with cerebrotendinous xanthomatosis: case series. Neurol Sci 2017;38:481-3. IF: 2,285

58. Nagy B Jr, Nagy B, Kappelmayer J, **Balogh I**. A humán epididymis protein 4 vizsgálatának labor diagnosztikai jelentősége cystás fibrosisban: kezdeti eredmények. Mucoviscidosis Hungarica 2017;3:99-105.

59. Orosz O, Fodor M, **Balogh I**, Losonczy G. Relative anterior microphthalmos in oculodentodigital dysplasia. Indian J Ophthalmol 2018;66:334-6. IF: 0,977

60. Koczok K, Gurumurthy CB, **Balogh I**, Korade Z, Mirnics K. Subcellular localization of sterol biosynthesis enzymes. J Mol Histol 2019;50:63-73. IF: 2,937

61. Nagy B, Jr., Bene Z, Fejes Z, Heltshe SL, Reid D, Ronan NJ, McCarthy Y, Smith D, Nagy A, Joseloff E, Balla G, Kappelmayer J, Macek M, Jr., Bell SC, Plant BJ, Amaral MD, **Balogh I**. Human epididymis protein 4 (HE4) levels inversely correlate with lung function improvement (delta FEV1) in cystic fibrosis patients receiving ivacaftor treatment. J Cyst Fibros 2019;18:271-7. IF: 4,290

62. Nagy O, Kartesz J, Hartwig M, Bertalan R, Javorszky E, Erhardt E, Patocs A, Tornoczky T, **Balogh I**, Ujfalusi A. The importance of the multiplex ligation-dependent probe amplification in the identification of a novel two-exon deletion of the NR5A1 gene in a patient with 46,XY differences of sex development. Mol Biol Rep 2019;46:5595-601. IF: 2,107

63. Nagy O, Szakszon K, Biro BO, Mogyorosy G, Nagy D, Nagy B, **Balogh I**, Ujfalusi A. Copy number variants detection by microarray and multiplex ligation-dependent probe amplification in congenital heart diseases. J Biotechnol 2019;299:86-95. IF: 3,163

FELSŐOKTATÁSI TANKÖNYV RÉSZEK

64. **Balogh I**, Antal-Szalmás P. Anyagcsere rendellenességek molekuláris genetikai diagnosztikája. In: Kappelmayer, János; Muszbek, László (szerk.) Laboratóriumi diagnosztikai gyakorlatok. Debrecen, Magyarország: Debreceni Egyetem, 2010:9-18.

65. **Balogh I**, Antal-Szalmás P. Molecular genetic diagnosis of inherited metabolic disorders. In: Kappelmayer, János; Muszbek, László (ed.) Practicals in laboratory medicine. Debrecen, Magyarország: Debreceni Egyetem, 2010:9-18.

66. **Balogh I.** Farmakogenetika. In: Oláh É (szerk.) Klinikai genetika: egyetemi tankönyv. Budapest, Magyarország: Medicina Könyvkiadó Zrt, 2015:299-305.

KÖNYVFEJEZET, SZAKTANULMÁNY

67. Gaál Zs, **Balogh I.** Monogenic Forms of Diabetes Mellitus. In: Igaz P, Patócs A (ed.) Genetics of Endocrine Diseases and Syndromes. Cham, Svájc: Springer International Publishing, 2019:385-416.

68. **Balogh I.** A cystás fibrosis molekuláris genetikai diagnosztikája. In: Debreczeni L, Kovacs GL (szerk.) Gyakorlati laboratóriumi medicina, Budapest, Magyarország: Literatura Medica Kiadó Kft, 2008:520-1.

CSOPORTOS (MULTICENTRIKUS) KÖZLEMÉNYBEN KOLLABORÁCIÓS KÖZREMŰKÖDŐ

69. Heard JM, Bellettato C, van Lingen C, Scarpa M and the MetabERN collaboration group. Research activity and capability in the European reference network MetabERN. Orphanet J Rare Dis 2019; 14:119. IF: 3,687

TUDOMÁNYMETRIAI ADATOK

Balogh István tudományos és oktatási közleményeinek összefoglalása
MTA V. Orvostudományi Osztály (2020.05.14)

Tudományos és oktatási közlemények	Szám		Hivatkozások ¹	
	Összesen	Részletezve	Független	Összes
I. Folyóiratcikk²	80	---	---	---
szakcikk nemzetközi folyóiratban, idegen nyelvű	---	46	601	764
szakcikk, hazai idegen nyelvű	---	1	4	4
szakcikk, magyar nyelvű	---	17	8	8
szakcikk, sokszerzős, érdemi szerzőként ³	---	1	24	42
összefoglaló közlemény	---	3	1	1
rövid közlemény	---	12	104	137
II. Könyv	0	---	---	---
a) Szakkönyv, kézikönyv, tankönyv szerzőként	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	0	0
magyar nyelvű	---	0	0	0
aa) Felsőoktatási tankönyv	---	0	0	0
b) Szakkönyv, kézikönyv, konferenciakötet, tankönyv szerkesztőként	0	---	---	---
idegen nyelvű	---	0	---	---
magyar nyelvű	---	0	---	---
bb) Felsőoktatási tankönyv	---	0	---	---
III. Könyvrészlet	5	---	---	---
idegen nyelvű	---	1	1	1
magyar nyelvű	---	1	0	0
cc) Felsőoktatási tankönyvfelvezet	---	3	0	0
IV. Konferenciaközlemény⁴	1	---	0	0
Oktatási közlemények összesen (II.aa,bb-III.cc)	---	3	0	0
Tudományos közlemények összesen (I-IV.)	---	83	743	957
Tudományos és oktatási közlemények összesen (I-IV.)	86	---	743	957
V. További tudományos művek	6	---	---	---
További tudományos művek, ide értve a nem teljes folyóiratcikket és a nem ismert lektorált sűrű folyóiratokban megjelent teljes folyóiratcikket is	---	2	0	0
Szerkesztőségi levelezés, hozzászólások, válaszok	---	4	8	12
Olthalmak, szabadalmak	---	0	0	0
VI. Hivatkozott absztraktok⁵	1	---	0	1
Összes hivatkozás¹	---	---	751	970
Hirsch index⁶	16	---	---	---
g index⁶	29	---	---	---

Speciális tudománymetriai adatok	Száma	Összes hivatkozás
Első szerzős teljes folyóiratcikkek száma ²	6	265
Utolsó szerzős teljes folyóiratcikkek száma ²	21	84
A tudományos fokozat (PhD) elnyerése utáni (2000) teljes tudományos folyóiratcikkek száma	66	564
Az utolsó 10 év (2010 - 2020) tudományos, teljes, lektorált tudományos folyóiratcikkeinek száma	52	223
A legmagasabb hivatkozottságú közlemény hivatkozásainak száma (az összes hivatkozás százalékában)	130	13,4%
Hivatkozások száma, amelyek nem szerepelnek a WoS/Scopus rendszerben	---	23
Jelentés, guideline	0	0
Csoportos (multicentrikus) közleményben kollaborációs közreműködő ⁷	1	1